

**Strukturbasierte Entwicklung und Charakterisierung von Inhibitoren
der TGT, ein mögliches Ziel zur Therapie der Bakterienruhr**

Dissertation

zur

Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften
(Dr.rer.nat.)

dem

Fachbereich Pharmazie der
Philipps-Universität Marburg
vorgelegt von

Frederik Rainer Ehrmann
aus **Kassel**

Marburg/Lahn **2016**

Erstgutachter: Prof. Dr. Gerhard Klebe

Zweitgutachter: Prof. Dr. Klaus Reuter

Eingereicht am 29.11.2016

Tag der mündlichen Prüfung: 31.01.2017

Hochschulkennziffer: 1180

Die Untersuchungen zur vorliegenden Arbeit wurden auf Anregung von Herrn Prof. Dr. Gerhard Klebe am Institut für Pharmazeutische Chemie des Fachbereichs Pharmazie der Philipps-Universität Marburg in der Zeit vom Juni 2012 bis November 2016 durchgeführt.

Für Katharina

Die Optimierung von Wirkstoffen folgt einem Prozess, der sich am besten mit den Worten
des Philosophen Sir Karl Popper charakterisieren lässt:

»Die Wahrheit ist objektiv und absolut. Aber wir können niemals sicher sein, dass wir sie
gefunden haben. Unser Wissen ist immer Vermutungswissen. Unsere Theorien sind
Hypothesen. Wir prüfen auf Wahrheit, indem wir das Falsche ausscheiden.«

(Objective Knowledge, 1972)

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen und Poster

Aus der vorliegenden Arbeit sind folgende Publikationen und Posterbeiträge auf Konferenzen hervorgegangen:

Publikationen

Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT) (2015)

Barandun, L.J.*, Ehrmann, F.R.*, Zimmerli, D., Immekus, F., Giroud, M., Grünenfelder, C., Schweizer, W.B., Bernet, B., Betz, M., Heine, A., Klebe, G., Diederich, F. [*equally contributed],
Chem. Eur.J. 21, 126-135 (**Kapitel 2**^[1])

Soaking versus Cococrystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric Protein upon Ligand Binding (2016)

Ehrmann, F.R., Stojko, J., Metz, A., Debaene, F., Barandun, L.J., Heine, A., Diederich, F., Cianférani, S., Reuter, K., Klebe, G., *ACS Chem. Biol.* [eingereicht] (**Kapitel 3**)

An Immucillin-based Transition State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT) (2016)

Hohn, C., Härtsch, A., Ehrmann, F.R., Pfaffender, T., Trapp, N., Dumele, O., Klebe, G., Diederich, F.,
Chem. Eur.J. 22, 6750-6754 (**Kapitel 8**^[2])

Occupying a Flat Subpocket in tRNA-modifying Enzyme with Ordered or Disordered Sidechains: Favorable or Unfavorable for Binding? (2016)

Neeb, M., Hohn, C., Ehrmann, F.R., Härtsch, A., Heine, A., Diederich, F., Klebe, G.,
Bioorg. Med. Chem. 24, 4900-4910^[3]

Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study (2016)

Schiebel, J., Radeva, N., Krimmer, S.G., Wang, X., Stieler, M., Ehrmann, F.R., Fu, K., Metz, A., Huschmann, F.U., Weiss, M., Mueller, U., Heine, A., Klebe, G.,
ACS Chem. Biol. 11, 1693-1701 (**Kapitel 5**^[4])

Active Site Mapping of an Aspartic Protease by Multiple Fragment Crystal Structures: Versatile Warheads to Address a Catalytic Dyad (2016)

Radeva, N., Schiebel, J., Wang, X., Krimmer, S.G., Fu, K., Stieler, M., Ehrmann, F.R., Metz, A., Rickmeyer, T., Betz, M., Winquist, J., Park, A.Y., Huschmann, F.U., Weiss, M., Mueller, U., Heine, A., Klebe, G.,
J. Med. Chem. 59, 9743-9759 (**Kapitel 5**^[5])

Experimental Active-Site Mapping by Fragments: Hot Spots Remote from the Catalytic Center of Endothiapepsin (2016)

Radeva, N., Krimmer, S.G., Stieler, M., Fu, K., Wang, X., Ehrmann, F.R., Metz, A., Huschmann, F.U., Weiss, M., Mueller, U., Schiebel, J., Heine, A., Klebe, G.,
J. Med. Chem. 59, 7561-7575 (**Kapitel 5**^[6])

High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits (2016)

Schiebel, J., Krimmer, S.G., Röwer, K., Knörlein, A., Wang, X., Park, A.Y., Stieler, M., Ehrmann, F.R., Fu, K., Radeva, N., Krug, M., Huschmann, F.U., Glöckner, S., Weiss, M., Mueller, U., Klebe, G., Heine, A.,
Structure 24, 1398-1409 (**Kapitel 5**^[7])

Watch out for the Red Herring: Surprising Reactivity of a Fragment Results in Biological Activity (2016)

Cramer, J., Schiebel, J., Wulsdorf, T., Grohe, K., Najbauer, E.E., Ehrmann, F.R., Radeva, N., Zitzer, N., Linne, U., Linser, R., Heine, A., Klebe, G.,
Angew. Chem. (**Kapitel 5**)

Posterbeiträge auf Konferenzen

Optimal Ligand Portion to Address the TGT Ribose-34 Pocket and Replace an Active Site Water Cluster (2013)

Ehrmann, F. R., Barandun, L. J., Betz, M., Heine, A., Diederich, F., Klebe, G.,

DGK-Workshop, Berlin, Germany (Kapitel 2)

Active Site Inhibitors Disturbing the Dimerization of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT) an Ideal Target of Shigellosis (2014)

Ehrmann, F. R., Barandun, L. J., Debaene, F., Betz, M., Heine, A., Sanglier-Cianférani, S., Diederich, F., Klebe, G.,

DPhG Annual Meeting, Frankfurt, Germany (Kapitel 3)

X-ray Crystallography and nanoESI-MS Reveal Active Site Inhibitors Perturbing the Dimerization of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT) (2015)

Ehrmann, F. R., Debaene, F., Stojko, J., Barandun, L. J., Pfaffender, T., Heine, A., Diederich, F., Sanglier-Cianférani, S., Klebe, G.,

NovAliX Conference - Biophysics in Drug Discovery, Strasbourg, France (Kapitel 3)

Inhaltsverzeichnis

Aus dieser Dissertation hervorgegangene Publikationen und Poster	7
Inhaltsverzeichnis	9
1. Einleitung und Motivation	15
1.1 Strukturbasierte Wirkstoffentwicklung und TGT.....	15
1.2 Aufgabenstellung und Ziele der Arbeit	17
1.3 Bakterienruhr	19
1.3.1 Übertragung, Verlauf und Epidemiologie der Erkrankung.....	19
1.3.2 Therapie	20
1.3.3 Klassifikation von <i>Shigellen</i>	21
1.3.4 Zelluläre und molekulare Pathogenese	22
1.4 Rolle und Funktion von VirF und tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT)	24
1.5 Biosynthese von Queuin in Prokaryoten	25
1.6 TGT-katalysierte Basenaustauschreaktion	27
1.7 Struktur der bakteriellen <i>Z. mobilis</i> TGT	28
1.7.1 Sekundärstruktur	28
1.7.2 Quartärstruktur	30
1.7.3 Aktives Zentrum	32
2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended lin-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)	33
2.1 Vorwort	33
2.2 Abstract	34
2.3 Introduction	34
2.4 Results and Discussion.....	36
2.4.1 Synthesis and Conformational analysis	36
2.4.2 Binding affinities	37
2.4.3 X-ray co-crystal structures	37
2.4.4 Phosphate mimic	41
2.5 Conclusion.....	42
2.6 Experimental Section.....	43
3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding	45
3.1 Vorwort	45

3.2 Abstract	46
3.3 Introduction.....	46
3.4 Results & Discussion.....	50
3.4.1 Overview and Intention of Crystal structures.....	50
3.4.2 Methylation of the Furanoside 3'-Hydroxyl Group Clearly Impacts the Architecture of the TGT Dimer Interface.	51
3.4.3 The Influence of Ligand 3.3 on Dimer Architecture is not Revealed by Soaking 3.3 into apo-TGT Crystals.	55
3.4.4 Ligands 3.5 and 3.6 Differing in Aliphatic Ring Size, Exert Distinct Influence on TGT Dimer Architecture.....	58
3.4.5 Co-Crystallization of TGT with 3.7 Reverses the Space Group Change Observed in Soaked Crystal Structure.....	60
3.4.6 Shrinking OMe to Me at the 4-Substituent still Disturbs TGT Dimer Interface Architecture.....	62
3.4.7 Removal of the Terminal Methyl Group in 3.9 Triggers a Profound Rearrangement of the Homodimer.	64
3.4.8 Native MS Study of in-Solution TGT:Ligand Mixtures Confirms Ligand-Induced Dimer Destabilization	68
3.4.9 Inhibition Constants and Thermodynamic Profiles.....	69
3.5 Summary and Conclusion	73
4. Carbamat-geschützte <i>lin</i>-Benzoguanine als mögliche <i>Prodrug</i>-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane.....	79
4.1 Vorwort.....	79
4.2 Einleitung.....	80
4.2.1 <i>Prodrugs</i> in der Pharmazeutischen Industrie.....	80
4.2.2 Design der Carbamat-geschützten <i>lin</i> -Benzoguanine.....	83
4.3 Ergebnisse und Diskussion.....	86
4.3.1 Physikochemische Ergebnisse	86
4.3.2 Kokristallstrukturen der Carbamat-geschützten <i>lin</i> -Benzoguanine	87
4.4 Zusammenfassung	91
5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ₁-Bindetasche	93
5.1 Vorwort.....	93
5.2 Einleitung.....	94
5.3 Ergebnisse und Diskussion	96
5.3.1 Kokristallstrukturen und Charakterisierung der Benzimidazol-basierten Inhibitoren	96
5.3.2 Erweiterung der Guanin/preQ ₁ -Bindetasche bestätigt durch eine MD-Simulation	104

5.3.3 Vergleich der Taschenerweiterungen der Guanin/preQ ₁ -Bindetasche von bakterieller und humaner TGT	109
5.3.4 Erster Versuch die neue Taschenerweiterung zu adressieren	110
5.4 Zusammenfassung	112
6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten <i>lin</i>-Benzoguaninen.....	115
6.1 Vorwort	115
6.2 Einleitung	116
6.3 Ergebnisse und Diskussion	118
6.3.1 Kokristallstrukturen der C(2)-Monosaccharid-basierten <i>lin</i> -Benzoguanine.....	119
6.3.2 Thermodynamische Signaturen und Bindungsaffinitäten von 6.1 und 6.2	124
6.4 Zusammenfassung	126
7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden.....	129
7.1 Vorwort	129
7.2 Einleitung	130
7.3 Ergebnisse und Diskussion	131
7.3.1 Bindungsmodi und strukturelle Unterschiede in den Kokristallstrukturen der Monosaccharid-basierten <i>lin</i> -Benzoguanine 7.1 – 7.3	131
7.3.2 Einflüsse der Ligandbindung von 7.1 – 7.3 auf den Dimer- <i>Interface Hotspot</i> und die Zink-Subdomäne der TGT	137
7.3.3 Bindungsaffinitäten, thermodynamische Signaturen und nanoESI-MS Ergebnisse	141
7.4 Zusammenfassung	142
8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT).....	145
8.1 Vorwort	145
8.2 Abstract	146
8.3 Introduction	146
8.4 Results and Discussion.....	148
8.4.1 Synthesis	148
8.4.2 Single-molecule crystal structure and modelled TGT complex with inhibitor 8.1	148
8.4.3 Co-crystal structure of <i>Z. mobilis</i> TGT with inhibitor 8.1 and inhibition constant determination	149
8.5 Conclusion.....	151
8.6 Experimental Section.....	151
9. Fragment-basierte Leitstruktursuche anhand der Aspartylprotease Endothiapepsin.....	153
9.1 Vorwort	153

9.2 Resultierende Publikationen.....	154
9.3 Zusammenfassung der Ergebnisse	154
10. Vergleichender Überblick, Ausblick und Zusammenfassung.....	161
10.1 Vergleichender Überblick	161
10.2 Ausblick.....	167
10.3 Zusammenfassung - Deutsche Fassung.....	169
10.4 Summary – English Version.....	171
11. Material und Methoden	173
11.1 Chemikalien	173
11.2 Geräte	174
11.3 Lösungen, Puffer und Medien	175
11.4 Bakterienstämme und Plasmide.....	176
11.5 Molekularbiologische Methoden	177
11.5.1 Expression und Aufreinigung der <i>Z. mobilis</i> TGT	177
11.5.2 SDS-PAGE.....	178
11.5.3 <i>In vitro</i> Transkription und Aufreinigung von tRNA	179
11.5.4 Agarose Gel Elektrophorese	179
11.5.5 Konzentrationsbestimmung von Protein, DNA und tRNA	180
11.6 Kinetische und thermodynamische Methoden.....	180
11.6.1 Enzymkinetische Untersuchung unter Verwendung des Radioaktivassays.....	180
11.6.2 Thermodynamische Untersuchungen mit Hilfe der ITC	182
11.7 Röntgenkristallographische Untersuchungen.....	183
11.7.1 <i>Z. mobilis</i> TGT Kristallisation	183
11.7.2 Datensammlung und Prozessierung.....	184
11.7.3 Strukturbestimmung, Verfeinerung und Analyse	184
11.8 Weitere biophysikalische Untersuchungen	187
11.8.1 Native Massenspektroskopie	187
11.8.2 PAMPA Messungen.....	188
11.8.3 pK _a Messungen.....	188
11.9 Synthese der untersuchten TGT-Inhibitoren	189
12. Appendix	191
12.1 Thermogramme und Regressionskurven (ITC).....	191
12.2 Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken.....	192
12.3 Untersuchte TGT-Inhibitoren.....	197

13. Referenzen	201
Abkürzungsverzeichnis	215
Danksagung.....	219
Eidesstattliche Erklärung	222
Lebenslauf	223

1. Einleitung und Motivation

1.1 Strukturbasierte Wirkstoffentwicklung und TGT

Die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung (SBDD, *Structure based drug discovery*) umfasst den gezielten Entwurf therapeutisch wirksamer Substanzen anhand dreidimensionaler Strukturen einer makromolekularen Zielstruktur. Diese werden durch strukturgebende Verfahren wie der Röntgenstrukturanalyse oder zum geringen Teil auch durch die NMR-Spektroskopie erhalten.

Heutzutage ist SBDD ein wesentlicher Bestandteil des modernen präklinischen Entwicklungsprozesses von Wirkstoffkandidaten. Dazu ist ein Zusammenspiel verschiedener Disziplinen notwendig. Die strukturgebende Technik wird von biophysikalischen *Assays*, computergestütztem Design und der Synthese von Wirkstoffkandidaten komplementiert^[8].

Essentielle Voraussetzung ist allerdings, dass das krankheitsbezogene Ziel (Protein/Makromolekül) identifiziert, aufgereinigt und dessen dreidimensionale Struktur bestimmt wurde. Fragment-basierte Techniken (FBDD, *Fragment based drug discovery*; **Kapitel 9**), virtuelles *Screening*, *Molecular Modelling* und *Docking* am Computer oder Ermittlung von Treffern aus Hochdurchsatz-Screenings (HTS) können erste Hinweise auf Kandidaten zur weiteren Optimierung liefern. Das detaillierte Verständnis physiologischer und pathophysiologischer Prozesse sowie Wechselwirkungen mit dem Substrat oder Inhibitoren sind Voraussetzungen einer effizienten Wirkstoffentwicklung. Das Hauptaugenmerk liegt jedoch bei der Identifizierung der konkreten Interaktionen der untersuchten Verbindungen zum Makromolekül. Emil Fischer hatte schon 1894 folgendes Bild entworfen: Ist das Schloss (makromolekulares Ziel) bekannt, wird der Schlüssel (Ligand) entsprechend angepasst^[9]. Dabei ist das Schloss kein starres, sondern ein dynamisches Gebilde und der ebenfalls konformativ flexible Schlüssel muss in iterativen Prozessen optimiert werden. Zusätzlich wurden durch die Einführung der prominenten *Rule of Five* von Lipinski im Jahr 1997 physikochemische Vorgaben in die frühe Arzneimittelentwicklung eingebettet^[10]. Heutzutage berücksichtigt die präklinische Arzneimittelentwicklung auch Faktoren wie Adsorption, Verteilung, Metabolisierung, Ausscheidung und Toxizität (ADMET; *Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity*) eines Wirkstoffkandidaten. Das Berücksichtigen der ADMET-Eigenschaften in der frühen Entwicklung hat einen signifikanten Einfluss auf zukünftige Arzneistoffe. So kann das Scheitern von Arzneistoffen in späteren Entwicklungsphasen der klinischen Studien reduziert werden.

Die Entdeckung von therapeutisch wirksamen Substanzen hat sich seit den frühen glücklichen Zufällen geschuldeten Beobachtungen, wie die Entdeckung des Penicillins von Alexander Fleming im Jahr 1928, stark verändert.

1. Einleitung und Motivation

Trotz der immensen technologischen Fortschritte und der tiefgreifenden Erkenntnisse über biologische Prozesse, molekulare Erkennungsprinzipien und der organischen stereoselektiven Synthese von Inhibitoren, ist die Entwicklung eines neuen Medikaments noch immer ein langer und sehr teurer Prozess. Es erfordert Investitionen von rund 800 bis 1600 Millionen US-Dollar und dauert von der Identifizierung eines geeigneten Ziels bis hin zur Markteinführung eines neuen Medikaments im Durchschnitt mehr als zehn Jahre^[11].

Die im universitären Umfeld entwickelten Liganden erfüllen in aller Regel noch nicht die Kriterien einer marktreifen wirksamen Substanz. Sie können jedoch der industriellen Forschung ergänzende Zuarbeit leisten und neue Erkenntnisse vor allem in methodischer Hinsicht generieren. Das Enzym tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) steht beispielhaft für einen Fall, bei der die Inhibition direkt die Pathogenität der Bakterienruhr/Shigellose reduziert (**Abschnitt 1.4**). Somit stellt die TGT eine Zielstruktur für potentiell wirksame Substanzen gegen die ursächliche Verbreitung und Infektion durch *Shigella*-Bakterien dar. Bei der TGT handelt es sich darüber hinaus um ein gut etabliertes System, bestehend aus kristallisierbarem Protein, einer Vielzahl von Liganden und Methoden zur Bestimmung von Affinitäten und thermodynamischen Signaturen.

Ähnlich wie der Umfang an Strukturdaten in der *protein data bank* (PDB, www.rcsb.org; 124588 Einträge am 29.11.2016) nahezu exponentiell wächst und somit die Grundvoraussetzung für die Durchführung des strukturbasierten Wirkstoffdesigns liefert, stehen auch von der TGT heute eine Vielzahl von Proteinstrukturen zur Verfügung (109 Einträge am 29.11.2016). Auch Kristallstrukturen des selben Proteins, einschließlich Strukturen im Komplex mit verschiedenen Substratmolekülen und Liganden, mutierten Varianten des Enzyms oder Orthologe aus verwandten Organismen, haben einen enormen Stellenwert für die Entwicklung von Inhibitoren.

Im Rahmen der universitären Forschung konnten für die TGT bereits hochpotente Inhibitoren entwickelt und charakterisiert werden^[12-14]. In weiteren Arbeiten konnte ein direkter Zusammenhang zwischen katalytischer Aktivität und Ausbildung einer homodimeren Form gezeigt werden^[15-17]. Der Fokus bei der Hemmung von Proteinfunktionen liegt in der Regel auf der Blockierung des aktiven Zentrums durch geeignete kompetitive Liganden. Alternative Inhibitionsmechanismen wie die Störung von Protein-Protein-Interaktionen (PPI) oder die Stabilisierung von katalytisch inaktiven oligomeren Formen, sind dagegen die Ausnahme. Dennoch stellen sie attraktive Optionen zur therapeutischen Intervention dar^[18-21]. Wie bei vielen Proteinkomplexen konnte auch für die TGT inzwischen nachgewiesen werden, dass eng abgegrenzte Bereiche des Homodimer-*Interfaces* (Kontaktfläche der zwei TGT-Monomere) überproportional zur Affinität beitragen und so genannte *Hotspots* bilden (siehe auch **Kapitel 3**)^[22-26].

1. Einleitung und Motivation

Erste Versuche die Dimerisierung der TGT durch PPI-Inhibitoren zu stören waren durchaus erfolgreich (**Kapitel 3 & 7**)^[27]. Im Bezug auf die Entwicklung von solchen PPI-Inhibitoren stellt die TGT ein gut zugängliches Modellsystem dar. Die bisher untersuchten Liganden der TGT sollten nicht nur hinsichtlich ihrer Bindungsaffinität und ihres Inhibitionsmechanismus, sondern auch unter dem Gesichtspunkt der Bioverfügbarkeit weiterentwickelt werden.

1.2 Aufgabenstellung und Ziele der Arbeit

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit sollten unterschiedliche Aspekte des strukturbasierten Wirkstoffdesigns anhand von Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT umgesetzt und entwickelt werden. Im Vordergrund stand die Analyse und Adressierung des aktiven Zentrums und der benachbarten Enzymtaschen der TGT durch neu entwickelte Liganden. Die Arbeit umfasst darüber hinaus Untersuchungen der Wasserstruktur in den angrenzenden Bindetaschen des aktiven Zentrums, Bestimmungen von thermodynamischen Signaturen und Bioverfügbarkeiten von Inhibitoren. Die Auswirkung des Kristallisationsprotokolls auf die erhaltenen Bindungsmodi der Liganden und deren mögliche indirekten Einflüsse auf die Dimerstabilität wird in einem ausführlichen Kapitel dieser Arbeit dargelegt. Außerdem werden Erkenntnisse aus einer Fragment-basierten Studie der Aspartylprotease Endothiapepsin beschrieben. Im Einzelnen werden folgende Aspekte behandelt:

- **Kapitel 2:** Das ladungsneutrale Verdrängen von Wassermolekülen in der tief vergrabenen Ribose-34/Phosphat-35-Tasche wird anhand von Furanosid-basierten *lin*-Benzoguaninen untersucht. Eine Überlagerung der TGT im Komplex mit tRNA-Fragmenten und den Komplexstrukturen der neu untersuchten Furanosid-basierten Inhibitoren zeigt, dass die Furanosyl-Substituenten der Inhibitoren auf der Position der Phosphatgruppe-35 der tRNA zu liegen kommen. Dies lässt darauf schließen, dass diese Monosaccharide generell eine Möglichkeit darstellen, um Phosphatbindetaschen zu adressieren.
- **Kapitel 3:** Der Einfluss des Kristallisationsprozesses auf die erhaltene dreidimensionale Struktur wurde umfänglich untersucht. Dabei zeigen die Kristallstrukturen, die durch die *Soaking*-Methode erhalten werden, bei den untersuchten Liganden zum Teil andere Bindungsmodi als in den korrespondierenden Kokristallstrukturen. Vor allem kann in den *Soaking*-Strukturen keine indirekte Destabilisierung des Homodimers durch den Liganden beobachtet werden. Diese ist nur in den Kokristallstrukturen sichtbar. Es wird gezeigt, dass kleinste Änderungen, wie das Einfügen von Methylgruppen oder die Ringerweiterung von fünf auf sechs Gliedern zu komplett unterschiedlichen Bindungsmodi der Ligand-Substituenten führen können.

1. Einleitung und Motivation

Dies ist in dem beschriebenen Fall mit der Störung des Dimer-*Interfaces* und mit einer kompletten Änderung der thermodynamischen Signatur des methylierten Ligandens verbunden. Eine durch Ligandbindung induzierte neue, tiefgreifend veränderte, oligomere Form des TGT-Homodimers unterstreicht den Einfluss des Kristallisationsprotokolls und ermöglicht einen neuen Inhibitionsmechanismus: Die Stabilisierung einer katalytisch inaktiven Quartärstruktur.

- **Kapitel 4:** Basierend auf den Erkenntnissen, dass die etablierten *lin*-Benzoguanin-Inhibitoren keine Membranpermeabilität aufweisen, wurde der Ansatz des *Prodrugs* mit verschiedenen Substituenten mittels PAMPA-Messungen untersucht. Neben dem erstmaligen Transport von TGT-Inhibitoren durch künstliche Zellmembrane, konnten in Kokristallstrukturen zwei der untersuchten *Prodrugs* identifiziert werden. Beide Liganden binden trotz der *Prodrug*-Substituenten in der TGT und könnten als Ausgangspunkt dienen, um die Ribose-34/Phosphat-35-Tasche zu adressieren.
- **Kapitel 5:** In einer Art retrospektiven Arbeit wurden die essentiellen Interaktionen der Guanin-34/preQ₁-Bindetasche anhand von Benzimidazol-basierten Inhibitoren untersucht. Eine zuvor nur durch eine MD-Simulation prognostizierte Taschenerweiterung konnte nun in den erhaltenen Kokristallstrukturen erstmals experimentell bestätigt werden. Guanidin-basierte Benzimidazole dienen als Ausgangspunkt für weitere Designzyklen zur Adressierung der neuen transienten Taschenerweiterung.
- **Kapitel 6:** Die ladungsneutrale Verdrängung von Wassermolekülen wurde auch in der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33/Uracil-33-Tasche anhand von Monosaccharid-basierten Liganden mittels ITC und Röntgenkristallographie untersucht. Es zeigte sich, dass die Verbindungen annähernd gleiche thermodynamische Signaturen besitzen, die Bindungsmodi der Monosaccharid-Substituenten jedoch komplett unterschiedlich sind.
- **Kapitel 7:** In diesem Kapitel werden drei Monosaccharid-basierte Verbindungen vorgestellt, die aufgrund der erhaltenen Erkenntnisse aus **Kapitel 3** entwickelt wurden. Sie wurden auf ihre Affinität und die Fähigkeit der indirekten Destabilisierung des Homodimers untersucht. Die drei Verbindungen zeigen in gleichem Ausmaß, dass deren Bindung entropisch getrieben und die Protein-Protein-Interaktion des Homodimers gestört wird. Bei zwei Verbindungen wurden Kokristalle der Raumgruppe *C2* und *P2₁* erhalten und somit liegt die TGT mit diesen Liganden sowohl in dem konventionellen, als auch in dem *gedrehten*, potentiell katalytisch inaktiven Dimer vor. Dies deutet darauf hin, dass die TGT in Lösung nach Zugabe dieser Liganden in einem Gleichgewicht aus zwei dimeren Formen vorliegt.

1. Einleitung und Motivation

- **Kapitel 8:** Die Etablierung eines Nukleosidderivats als Übergangszustand-Analogon für die TGT wird beschrieben. Der entwickelte Deazaguanin-basierte Inhibitor ahmt die Eigenschaften des zweiten Produkt-nahen Übergangszustandes des Katalysezyklus der TGT nach. Aufgrund der bekannten vorteilhaften physikochemischen Eigenschaften von Nukleosidderivaten stellt die neue Verbindung eine mögliche alternative Leitstruktur zu den etablierten *lin*-Benzoguaninen dar.
- **Kapitel 9:** In einem größer angelegten Projekt unter Beteiligung von neun Kristallographen der Arbeitsgruppe Klebe wurde die *in-house*-Fragmentbibliothek durch *Soaking*-Strukturen kristallographisch untersucht. Mit insgesamt 71 Treffern aus 361 Fragment-Kristallstrukturen, konnte der Einfluss des Verfeinerungsprozesses auf die finale Struktur festgehalten werden. In weiteren daraus resultierenden Publikationen wurde gezeigt, dass mit der Röntgenkristallographie falsch-positive Treffer aus initialen biophysikalischen *Screening*-Verfahren aufgedeckt werden können. Der Vergleich, der aus den *Screening*-Verfahren erhaltenen Treffer mit dem Datensatz der 361 Fragment-Kristallstrukturen, zeigt, dass die Röntgenkristallographie als wünschenswerte primär einzusetzende Alternative zu den etablierten initialen biochemischen und biophysikalischen *Screening*-Verfahren und nicht erst als *follow-up* Validierung verwendet werden sollte.

1.3 Bakterienruhr

1.3.1 Übertragung, Verlauf und Epidemiologie der Erkrankung

Die Bakterienruhr oder Shigellose ist eine von *Shigella*-Bakterien hervorgerufene entzündliche Dickdarmerkrankung, die in Deutschland zu den meldepflichtigen Durchfallerkrankungen zählt (§ 7 IfSG). Die *Shigella*-Bakterien lösen nach dem Eindringen in die Darmschleimhaut Entzündungsreaktionen verbunden mit kolikartigen Schmerzen, blutigem Stuhl, starkem Durchfall und Fieber aus. Die Infektion wird durch Aufnahme von kontaminiertem Wasser bzw. Lebensmitteln hervorgerufen^[28]. Die Aufnahme von nur 10 – 100 *Shigella*-Organismen reicht^[29] für die schwere Infektion, die in den 1990er Jahren zu über 165 Millionen Erkrankungen jährlich führte und pro Jahr über eine Millionen Todesopfer forderte^[30-32]. Aktuelleren Schätzungen zufolge sind die Zahlen mit 90 Millionen gemeldeten Fällen und 108.000 Todesopfer jedoch gesunken^[33]. Auch wenn die Bakterienruhr weltweit verbreitet ist, sind gemeldete Fallzahlen in Entwicklungsländern deutlich erhöht (**Abbildung 1.1**).

1. Einleitung und Motivation

Widrige Umstände wie Armut, unzureichende sanitäre Einrichtungen, Bürgerkriege und Naturkatastrophen verschlechtern die hygienischen Umstände und erhöhen so die Wahrscheinlichkeit einer Infektion^[28, 34].

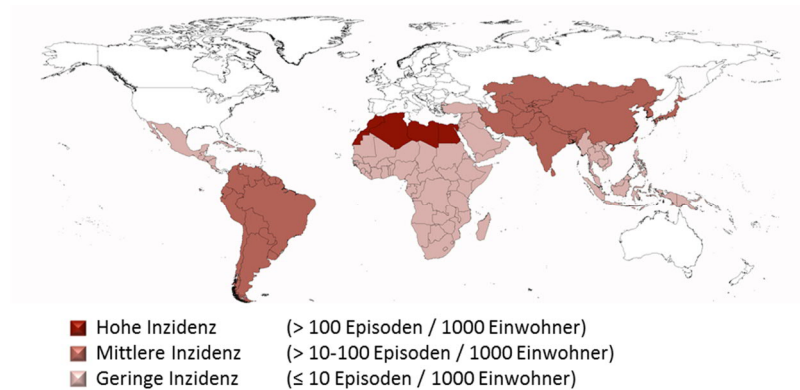


Abbildung 1.1 Inzidenz von gemeldeten Fällen der Bakterienruhr nach geographischen Regionen, 1984 – 2005. Angelehnt an *Ram et al. (2008)*^[34].

Allerdings ist eine steigende Zahl von Episoden auch in der industrialisierten Welt wie den USA, vor allem bei militärischen Truppen und Urlaubern zu finden^[35, 36]. Besonders tragisch sind die hohen Zahlen von Vorfällen bei Kindern unter fünf Jahren. Sie belaufen sich auf 70% aller Episoden und 45% aller Todesfälle^[28, 37].

1.3.2 Therapie

Nach einer Inkubationszeit von einem bis acht Tagen treten die oben genannten Symptome auf^[28]. Der Krankheitsverlauf hängt allerdings stark von verschiedenen Faktoren, wie dem infizierenden *Shigella*-Organismus, dem allgemeinen Gesundheitszustand und dem Alter des Patienten ab. Vor allem bei Säuglingen und Kindern kann sich die Bakterienruhr zu einer lebensbedrohlichen Situation entwickeln. Neben der Verbesserung der hygienischen Bedingungen, steht vor allem die Flüssigkeits- und Elektrolytsupplementation im Vordergrund^[28]. Bei schweren Verlaufsformen empfiehlt die WHO Antibiotika wie Ciprofloxacin, Ceftriaxon oder Azithromycin^[38, 39]. Aufgrund steigender Resistenzen wird die antibiotische Therapie jedoch immer mehr zur Herausforderung. Für gängige Antibiotika (Ampicillin, Cotrimoxazol und Nalidixinsäure), die in den 1990er Jahren in großem Umfang eingesetzt wurden, wurden mittlerweile vermehrt Resistenzen bei *Shigella*-Organismen festgestellt (**Abbildung 1.2**)^[31, 40-42].

1. Einleitung und Motivation

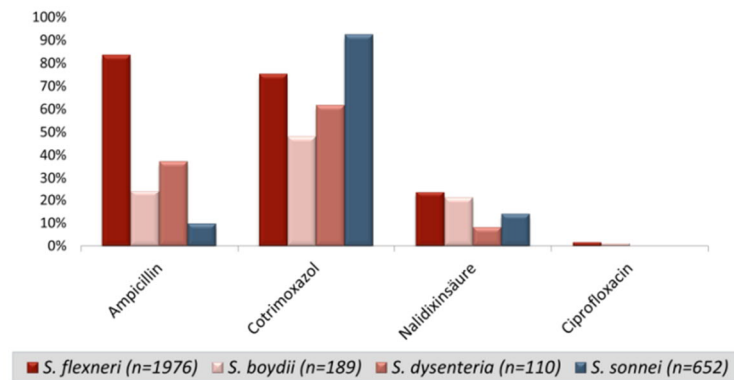


Abbildung 1.2. Antibiotikaresistenzen für die verschiedenen *Shigella*-Spezies gegenüber etablierten Antibiotika nach von Seidlein et al. (2006)^[40].

Eine Impfung gegen Bakterienruhr stellt eine attraktive Alternative zu der antibiotischen Therapie dar. Die Entwicklung von Polysaccharid-Konjugaten und Lebendimpfstoffen, basierend auf attenuiertem *Shigella dysenteriae* Typ 1, werden zurzeit vorangetrieben^[43-46]. Allerdings steht bis heute kein zugelassener Impfstoff zur Verfügung. Die weltweit zunehmenden Antibiotikaresistenzen und die fehlenden Impfstoffe gegen *Shigella*-Spezies erfordern dringend die Entwicklung neuer Medikamente zur Behandlung von Bakterienruhr. Die Entwicklung von möglichen Anti-Shigellose-Präparaten im universitären Umfeld abseits von unternehmenspolitischen Zielsetzungen könnte dabei einen entscheidenden Beitrag leisten.

1.3.3 Klassifikation von *Shigellen*

Shigellen sind gramnegative, unbegeißelte Stäbchenbakterien, die zu der Familie *Enterobacteriaceae* gehören^[32, 47-49]. Sie können weiterhin als nicht sporenbildend, fakultativ anaerob und unbeweglich beschrieben werden. Die Gattung *Shigella* kann in vier Spezies unterteilt werden (*Shigella dysenteriae*, *Shigella flexneri*, *Shigella sonnei* und *Shigella boydii*), welche wiederum in mehrere Serotypen untergliedert werden^[32]. Besonders schwer verlaufen Infektionen mit *S. dysenteriae* (16 Serotypen), welche das potente zytotoxische Shiga-Toxin produziert^[50]. In Folge kann das hämolytisch-urämische Syndrom (HUS) ausgelöst werden^[51]. Die Spezies tritt vermehrt in tropischen und subtropischen Regionen auf. Die Art *S. flexneri* (sechs Serotypen) kann als weniger pathogen eingestuft werden und kommt weltweit vor, vermehrt jedoch in Entwicklungsländern. Von *S. sonnei* ist bisher nur ein Serotyp beschrieben worden. Diese Art gilt als weniger pathogen. Sie kommt in Zentraleuropa vor und wird häufig bei Reisenden und Soldaten beobachtet^[36].

1. Einleitung und Motivation

Die in Indien und Nordafrika vorkommende Spezies *S. boydii* hat acht Serotypen und kann als relativ harmlos klassifiziert werden^[32].

In einer Arbeit von Escobar-Páramo aus dem Jahr 2004 konnten genetische Analysen zeigen, dass es sich bei *Shigella*-Bakterien eigentlich nicht um einen eigenen Genus handelt, sondern dass diese vielmehr als ein Subtyp von *Escherichia coli* anzusehen sind^[52]. Die einzelnen *Shigella*-Spezies entstanden wohl mehrmals unabhängig voneinander durch Aufnahme eines großen Virulenzplasmids (ca. $220 \cdot 10^3$ Basenpaare) sowie durch den anschließenden sukzessiven Verlust verschiedener chromosomal kodierter Gene, deren Produkte sich hemmend auf die Pathogenität auswirken. Eine sehr nahe Verwandtschaft zu *Shigella* zeigen enteroinvasive *E. coli* (EIEC), die ebenfalls über das Virulenzplasmid verfügen, jedoch einen milderen Krankheitsverlauf induzieren als "richtige" *Shigellen*. Sie werden als Intermediate bei der Evolution von harmlosen *E. coli* zu *Shigella* angesehen^[53].

1.3.4 Zelluläre und molekulare Pathogenese

Aufgrund der hohen Säurestabilität der *Shigellen* ist eine ungehinderte Magenpassage möglich^[54, 55]. Nach dem Passieren des Dünndarms dringen die Bakterien in die Epithelzellen des terminalen Ileums und des Kolons ein, was schwere Entzündungsreaktionen zur Folge hat. Die Invasion in die Epithelzellen erfolgt jedoch nicht von deren apikalen Seite, sondern indirekt über die M-Zellen der Peyer'schen Plaques (**Abbildung 1.3**)^[32]. Diese sind darauf spezialisiert, Bakterien durch das Dickdarmepithel zu schleusen und den assoziierten Makrophagen zu präsentieren. Beide, M-Zellen und Makrophagen, befinden sich im Follikel-assoziierten Epithelgewebe (FAE), welches Lymphfollikeln überdeckt und für die Darmimmunität verantwortlich ist.

Die *Shigellen* werden von den assoziierten Makrophagen aufgenommen. Dies allerdings überstehen sie unbeschadet, denn durch Aktivierung von Caspase-1 lösen sie die Apoptose der Makrophagen aus. Gleichzeitig werden durch die apoptotischen Vorgänge die Entzündungsinterleukine IL-1 β und IL-18 erzeugt^[32]. Durch Lyse der Zellwand werden diese, wie auch die *Shigellen*, nun auf der basolateralen Seite des Kolon-Epithels freigesetzt. Infolge können die Bakterien die Kolon-Epithelzellen *via* Makropinozytose befallen. Dort können sie sich ungehindert und vom Immunsystem weitgehend unentdeckt von Zelle zu Zelle ausbreiten. Die befallenen Zellen sezernieren IL-8, welches mit den oben genannten Interleukinen weitere Makrophagen und polymorphkernige Leukozyten (PML) anlockt^[32, 56]. Die letztgenannten Zellen zerstören die epitheliale Barriere der befallenen Zellen und erleichtern so die Invasion weiterer *Shigellen*.

1. Einleitung und Motivation

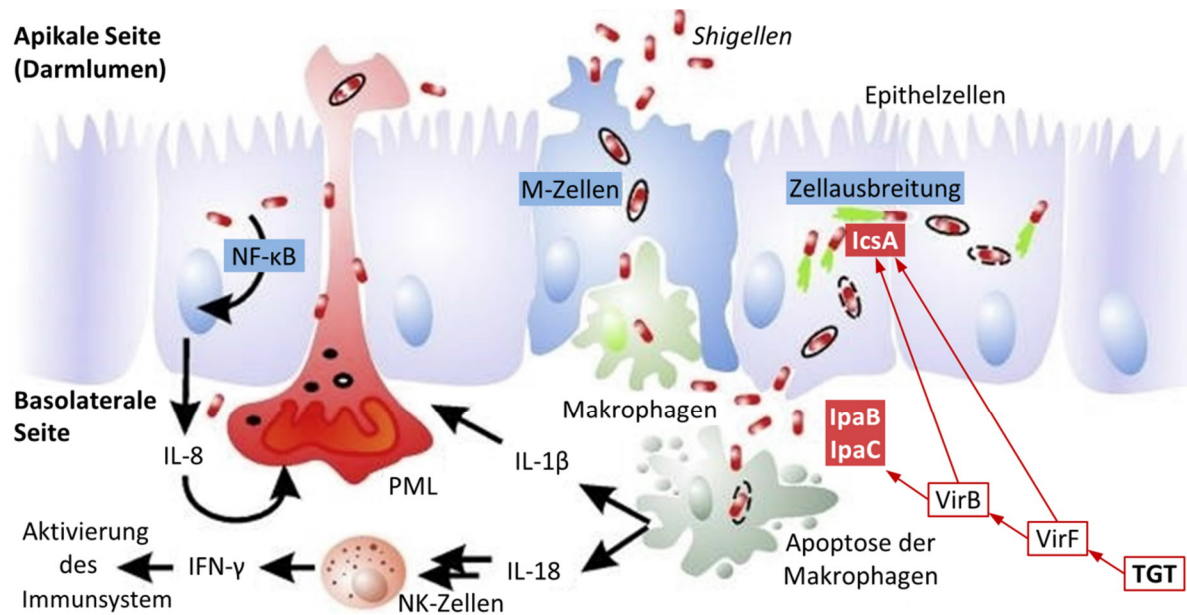


Abbildung 1.3. Schematischer Invasionsmechanismus der *Shigellen* in Epithelzellen des Dickdarms und involvierte Virulenzfaktoren modifiziert nach Schröder et al. (2008)^[57]. Die *Shigellen* nutzen die Transzytose der M-Zellen, um auf basolateraler Seite von Makrophagen aufgenommen zu werden. Nach induzierter Apoptose der Makrophagen können die *Shigellen* die Epithelzellen angreifen und sich dann innerhalb dieser von Zelle zu Zelle ausbreiten. Die wesentlichen Virulenzfaktoren sind rot markiert. Die initiale Regulation wird von VirF kontrolliert, welches wiederum von der TGT modifizierte tRNA benötigt.

Dies verstärkt die Entzündungsreaktion und führt zu einer fortschreitenden und unkontrollierten Gewebeerstörung. Im Gegensatz zu den Makrophagen sind polymorphkernige Leukozyten jedoch in der Lage *Shigellen* aufzunehmen und diese zu zersetzen. Zusammen mit NK-Zellen und T-Lymphozyten, die von IL-18 rekrutiert werden, sind sie schließlich in der Lage, die *Shigellen* in dem befallenen Darm vollständig auszurotten. Zusätzlich fördert IL-18 die Produktion von Interferon IFN-γ, das wiederum das Immunsystem weiter stimuliert^[32, 56].

Um die Zellinvasion, intrazelluläre Mobilität und Ausbreitung innerhalb der Epithelzellen, als auch die Induktion der Apoptose zu gewährleisten, produzieren die *Shigellen* verschiedene Virulenzfaktoren (**Abbildung 1.3**)^[58, 59]. Das Eindringen der *Shigellen* in die Epithelzellen erfordert einen Typ-III-Sekretionsapparat, dessen zahlreiche Komponenten von Genen des Virulenzplasmids kodiert werden^[32]. Der physikalische Kontakt des Sekretionsapparats mit der Zellwand der Epithelzelle löst die Sekretion von IpaB und IpaC aus. Diese bilden in der Wirtszellmembran eine Pore, bleiben dabei jedoch mit der Spitze der Translokonnadel assoziiert, sodass vom Bakterien- in das Wirtszellzytoplasma ein durchgehender Kanal entsteht.

1. Einleitung und Motivation

Durch diesen Kanal können im Anschluss weitere Virulenzfaktoren in die Wirtszelle sezerniert werden. IpaC, dessen C-Terminus in das Zytoplasma der Epithelzelle ragt, löst dort die Aktivierung der Tyrosinkinase Src aus, welche eine Signalkaskade aktiviert. Diese Kaskade bewirkt die Aktin-abhängige Bildung von Filopodien und Lamellipodien, die den Sekretionsapparat und infolge das ganze *Shigella*-Bakterium umschließen, was dessen makropinozytische Aufnahme in die Epithelzelle zur Folge hat. Nach der Aufnahme in die Wirtszelle löst sich die Vakuole, in der sich das Bakterium zunächst befindet, auf und es erfolgt die Freisetzung in das Zytoplasma. Um sich dort frei zu bewegen, wird der Virulenzfaktor IcsA (*intercellular spread*; VirG) erzeugt und an der Bakterienzellwand präsentiert. Die Bindung von N-WASP und Vinkulin an IcsA resultiert in einer Aktin-Polymerisation, die die Fortbewegung der Bakterien innerhalb der Wirtszellen ermöglicht^[60-63].

1.4 Rolle und Funktion von VirF und tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT)

Die Biosynthese der oben genannten Virulenzfaktoren und somit die Virulenz der *Shigellen* werden zentral durch die Transkriptionsfaktoren VirF und VirB kontrolliert (**Abbildung 1.3**). In einer Arbeit von Dorman aus dem Jahr 1998 zeigte sich für *S. flexneri*, dass die genetische Information nahezu aller Virulenzfaktoren auf einem einzigen Virulenzplasmid (230 kb) kodiert ist, wobei die meisten Invasionsgene innerhalb einer 31 kb Region liegen^[57, 64]. Die Transkriptionsfaktoren VirF und VirB aktivieren die Transkription von Virulenzfaktorgenen, wobei VirF die Konzentration von VirB und VirG (IcsA) kontrolliert (**Abbildung 1.3**). Indirekt kontrolliert VirF so auch die genannten Virulenzfaktoren IpaB und IpaC, da die Transkription der entsprechenden Gene durch VirB aktiviert wird. Dies zeigt, dass VirF ein essentieller Bestandteil der Pathogenitätskaskade der Bakterienruhr ist.

Die Regulation von VirF hängt von vielen Variablen wie Temperatur, pH-Wert, Osmolarität und Nährstoffsituation ab. Trotz optimaler Rahmenbedingungen (37°C, pH 7.4, physiologische Osmolarität, freies Arginin und Methionin) konnte gezeigt werden, dass die effektive Translation der VirF-mRNA zwei bestimmte tRNA-Modifikationen erfordert^[65]. Anhand von Gen-*knock-out* Experimenten wurde gezeigt, dass es sich dabei um Queuosin an Position-34, der ersten Stelle und *wobble*-Position des Anticodons, und um 2-Methylthio-N-6-isopentenyladenosin an Position-37 handelt. Die Modifikation an Position-37 ist auf das *miaA* Genprodukt angewiesen. Mutationen in diesem Gen reduzieren zum einen die zelluläre VirF-Konzentration von *Shigellen* auf 10% und zum anderen die hämolytische Aktivität auf 10 – 20% gegenüber dem Wild-Typ. Die Biosynthese von Queuosin in Position-34 wird unter anderem durch das *tgt/(vacC)*-Genprodukt bewerkstelligt. Verglichen mit dem Wild-Typ reduziert eine Mutation des entsprechenden Gens die Konzentration von VirF und die hämolytische Aktivität auf 50 – 60%^[65-67].

1. Einleitung und Motivation

Angeichts dessen, stellt die Hemmung dieser tRNA-modifizierenden Enzyme eine vielversprechende Möglichkeit dar, die Pathogenität von *Shigellen* zu reduzieren. Die tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT, EC 2.4.2.29), das Genprodukt des *tgt*-Gens aus *E.coli*, ist bereits umfassend charakterisiert worden^[68]. Daneben dient die TGT von *Zymomonas mobilis* als weiteres Modellsystem. Die beiden orthologen Enzyme sind mit 60.4% Sequenzidentität sehr ähnlich^[69]. Hinzu kommt, dass sich ihre aktiven Zentren nur an einer Position unterscheiden (Tyr106Phe; *Z. mobilis* TGT-Nummerierung). Mit der *Z. mobilis* TGT steht ein gut exprimierbares und kristallisierbares Protein zur Verfügung, welches die Grundlage für das strukturbasierte Wirkstoffdesign zur Entwicklung und Optimierung von Inhibitoren der TGT bildet^[69-71].

1.5 Biosynthese von Queuin in Prokaryoten

Im Gegensatz zur DNA, bei der die Abfolge der vier Standardbasen funktionsentscheidend ist, muss die RNA zur Erfüllung ihrer Aufgaben über eine große strukturelle Variabilität verfügen. Diese Vielfalt ist ein Resultat zahlreicher Modifikationen, die an den RNA-Basen vorgenommen werden. Bis heute wurden 112 verschiedene modifizierte RNA-Nukleoside aus verschiedenen Organismen beschrieben^[72-74]. Die *RNA modification database* dokumentiert alle bekannten post-transkriptionell modifizierten Nukleoside der RNA. Von den 112 dort beschriebenen modifizierten RNA-Nukleosiden treten 105 bei tRNAs auf^[73]. Eines dieser modifizierten Nukleoside ist das oben beschriebene Queuosin (Base Queuin). Bis auf wenige Ausnahmen (Mykobakterien, Corynebakterien, Streptomyceten und Bifidobakterien) sind alle Prokaryoten in der Lage Queuosin zu synthetisieren (**Abbildung 1.4**)^[75].

Der Basenaustausch von Guanin in Position-34 der tRNA durch den Queuin-Precursor preQ₁ wird von der tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) über einen Komplettaustausch der Base katalysiert^[76]. Die TGT vollzieht den Einbau von preQ₁ in tRNAs mit der Sequenz U₃₃G₃₄U₃₅N₃₆, wobei N für Adenin, Cytosin, Guanin oder Uracil steht. Daher akzeptiert die TGT nur tRNAs für die Aminosäuren Histidin, Tyrosin, Aspartat und Asparagin als Substrate.

Die modifizierte Base preQ₁ wird ausgehend von Guanosin-5-triphosphat (GTP) erhalten (**Abbildung 1.4**). Die mehrstufige Biosynthese wird von der GTP-Cyclohydrolase I (FolE)^[77], der 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin-Synthase (QueD)^[78], einem S-Adenosyl-L-Methionin-abhängigen organischen Radikal generierenden Enzym (QueE), der preQ₀-Synthetase (QueC)^[79] und schließlich einer Nitril-Reduktase (QueF)^[80] katalysiert (**Abbildung 1.4**).

1. Einleitung und Motivation

Im Anschluss wird das in die tRNA eingebaute preQ₁ weiter zu Queuin modifiziert. Zunächst wird eine Ribosylgruppe durch die S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase (QueA) an die exozyklische Aminofunktion angefügt^[81]. Schließlich wird durch die Vitamin B₁₂-abhängige Epoxiqueuosin-Reduktase (QueG) das erzeugte Epoxid reduziert und somit die Base in Queuin überführt^[82].

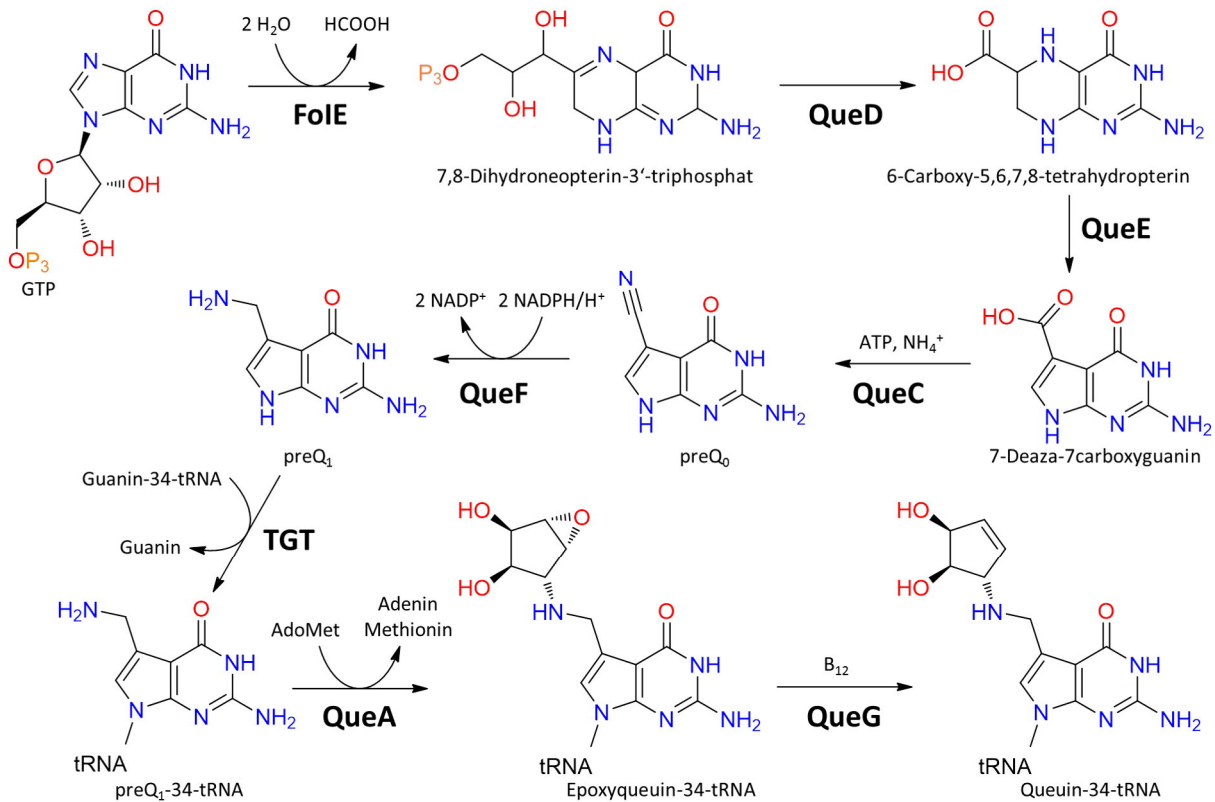


Abbildung 1.4. Biosynthese der modifizierten tRNA Base Queuin ausgehend von GTP, basierend auf Biela et al. (2013)^[83]. Folgende Substrate, Kosubstrate und Enzyme werden benötigt: GTP, Guanosin-5'-triphosphat; AdoMet, S-Adenosylmethionin; B₁₂, Coenzym B₁₂; preQ₀, 7-Cyano-7-deazaguanin; preQ₁, 7-Aminomethyl-7-deazaguanin; FoIE, GTP-Cyclohydrolase I; QueD, 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin-Synthase; QueE, 7-Carboxy-7-deazaguanine-Synthase; QueC, preQ₀-Synthetase; QueF, preQ₀-Reduktase; TGT, tRNA-Guanin-Transglycosylase; QueA, S-Adenosylmethionin-tRNA-Ribosyltransferase-Isomerase; QueG, Epoxiqueuosin-Reduktase.

Obwohl Eukaryoten ebenfalls mit Queuin modifizierte tRNA aufweisen, sind diese nicht in der Lage, Queuin auf einem entsprechenden Biosyntheseweg herzustellen. Sie sind vielmehr gezwungen, das Queuin-haltige Nukleosid Queuosin mit der Nahrung aufzunehmen. Daher wird Queuin direkt in die tRNA in einer einfachen Katalyse von eukaryotischen TGTs eingebaut^[84]. Es ist bekannt, dass Queuosin weiter durch Glykosylierung der Hydroxylgruppen modifiziert wird. Die damit verbundenen Enzyme sind bisher jedoch noch nicht ausreichend charakterisiert worden^[85].

1. Einleitung und Motivation

1.6 TGT-katalysierte Basenaustauschreaktion

Der Basenaustausch von Guanin in der Wobble Position-34 der tRNAs^{Asn,Asp,His,Tyr} gegen die modifizierte Base preQ₁ verläuft nach einem irreversiblen *ping-pong* Mechanismus^[16, 83]. Nachdem die tRNA an der TGT bindet, greift als erstes Asp280 nukleophil das C(1) der Ribose-34 an (**Abbildung 1.5a**). Dadurch bildet sich ein kovalentes TGT-tRNA-Intermediat (**Abbildung 1.5b**) und das abgespaltene Guanin verlässt die Bindetasche nach Aufnahme eines Protons. Nach jüngsten Erkenntnissen dient ein an Ala232 gebundenes Wassermolekül als Protonendonator und nicht Asp102, wie zuvor von Xie *et al.* (2003) angenommen^[16, 83].

Das Wassermolekül als Protonendonator dient auch der Argumentation für die Irreversibilität des Basenaustauschs. Es entstehen während der Katalyse Hydroxidionen (**Abbildung 1.5b**) und Oxoniumionen (**Abbildung 1.5d**). Die gegenseitige Neutralisierung entzieht beide Ionen dem Gleichgewicht und verhindert so, dass die Reaktion in rückwärtige Richtung verlaufen kann. Zusätzlich kann aufgrund der exozyklischen Aminogruppe von preQ₁ das Wassermolekül nicht zeitgleich mit der modifizierten Base in der Guanin-34/preQ₁-Tasche befinden.

Nachdem Guanin die Bindetasche verlassen hat, bindet preQ₁ an dieser Stelle (**Abbildung 1.5c**). Dies ist verbunden mit dem Umklappen der Amidbindung zwischen Leu231 und Ala232, bei der nun nicht mehr die Akzeptorfunktionalität (NH), sondern die Donorfunktionalität (C=O) in die Tasche ragt. Diese *induced-fit* Adaption der Peptidbindung wird durch Glu235 stabilisiert. In Abhängigkeit des Protonierungszustandes kann Glu235 sowohl mit der Carbonylgruppe von Leu231, als auch mit dem Amidstickstoff von Ala232 wechselwirken^[86]. Die exozyklische Aminofunktion des preQ₁ verdrängt in der Erkennungsstelle das zuvor beschriebene Wassermolekül/Hydroxidion und bildet nun eine Wasserstoffbrücke zu der Carbonylgruppe von Leu231 aus. Schließlich greift preQ₁ das C(1)-Atom der kovalent an Asp280 gebundenen Ribose-34 nukleophil an. Das freigesetzte Proton von N(9) wird von einem der umgebenden Wassermoleküle aufgenommen und es entsteht ein Oxoniumion. Im Anschluss wird das kovalente tRNA-TGT-Intermediat gespalten und die modifizierte tRNA freigesetzt (**Abbildung 1.5d**).

1. Einleitung und Motivation

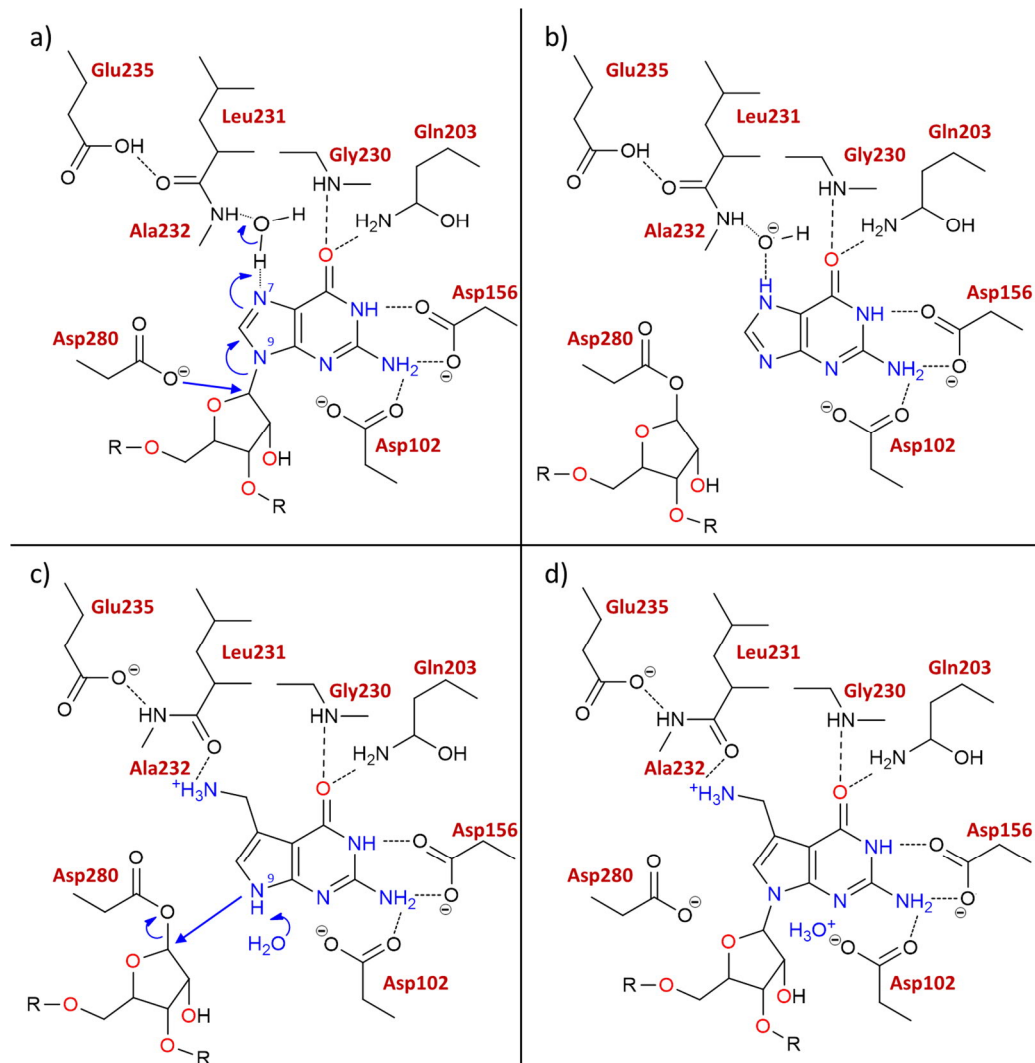


Abbildung 1.5. Katalysierter Basenaustausch der bakteriellen TGT gemäß Biela et al. (2013)^[83]. **a) und b):** Die glycosidische Bindung von Guanosin-34 wird durch einen nukleophilen Angriff gespalten, was in einem kovalenten TGT-tRNA-Intermediat resultiert. **c) und d):** preQ₁ wird ebenfalls durch einen nukleophilen Angriff eingebaut. Wasserstoffbrücken sind als gestrichelte Linien dargestellt.

1.7 Struktur der bakteriellen *Z. mobilis* TGT

1.7.1 Sekundärstruktur

Die *Z. mobilis* TGT (MW = 43 kDa) kann aufgrund der Anordnung von α -helicalen und β -Faltblatt-ähnlichen Strukturelementen den $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-barrel Enzymen zugeordnet werden (**Abbildung 1.6**)^[71, 86]. Ein Vertreter dieser Klasse ist die Triosephosphat-Isomerase (TIM) bei der dieses Faltungsmuster zuerst entdeckt wurde^[87]. Es besteht aus acht zylinderartig angeordneten β -Faltblättern, auf deren Außenseite überbrückende α -Helices angelagert sind. Bei der *Z. mobilis* TGT wird das TIM-barrel Motiv durch weitere Strukturelemente ergänzt (**Abbildung 1.6**)^[86].

1. Einleitung und Motivation

Diese umfassen am N-Terminus ein antiparalleles dreisträngiges β -Faltblatt, eine β 3- α 3-Insertion und eine Subdomäne, die die vierzählige Koordination des Zinkions ermöglicht. Die Helix α 8 des TIM-barrel Motivs ist ebenfalls an der Zink-Koordination beteiligt. Das aktive Zentrum befindet sich im Bereich des C-Terminus der β -Stränge des TIM-barrel Motivs (**Abbildung 1.7c**)^[68, 88]. Die β 3- α 3-Insertion mit dem β E β -Loop ist an der Erkennung bzw. Stabilisierung des tRNA Substrats beteiligt (**Abbildung 1.7b**)^[17].

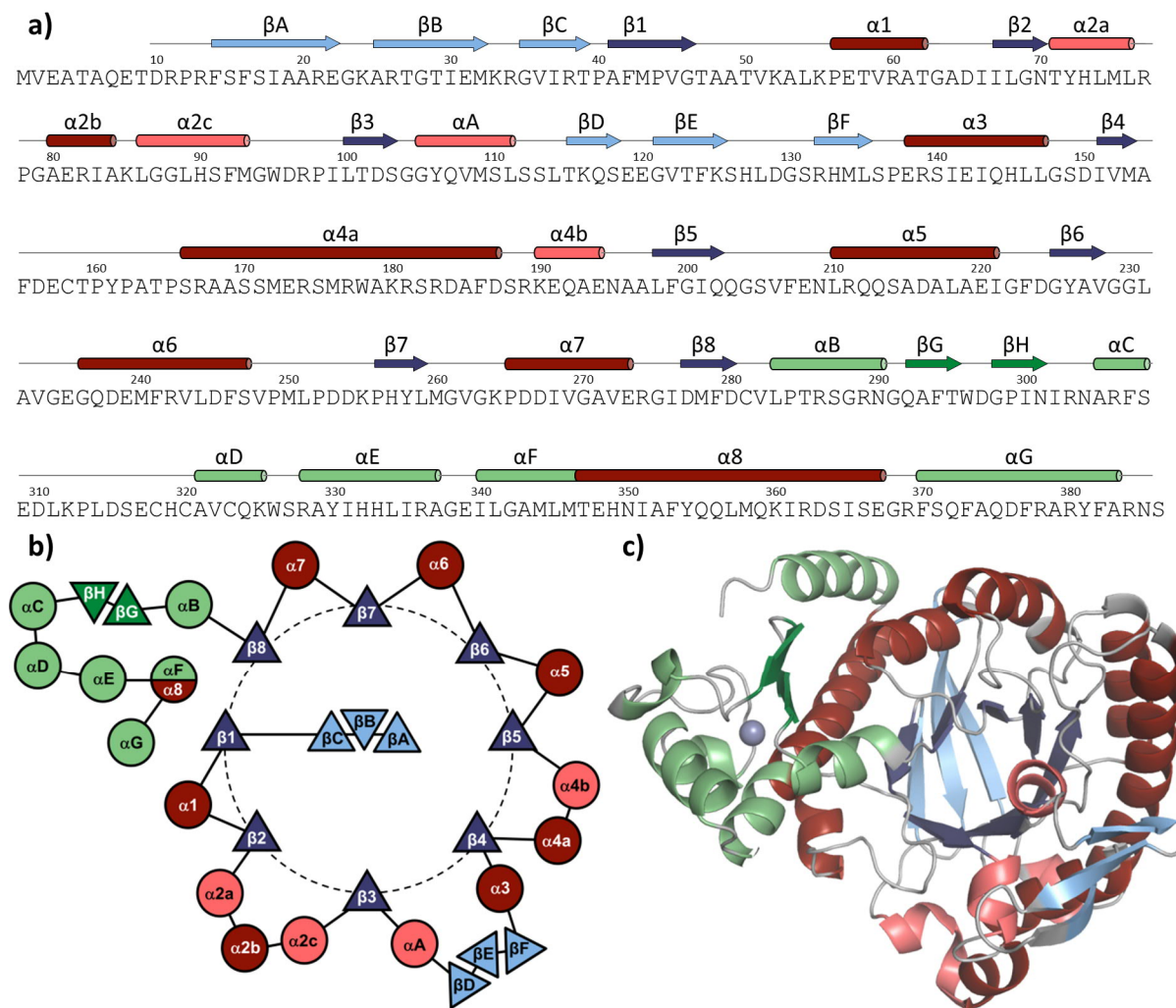


Abbildung 1.6. a) Primärsequenz der *Z. mobilis* TGT basierend auf Xie et al. (2003)^[16], **b)** Topologiediagramm der Sekundärstrukturelemente. β -Faltblätter sind als Dreiecke, α -Helices als Kreise dargestellt. Basierend auf Romier et al. (1996)^[71]. **c)** Röntgenkristallstruktur der apo-TGT (PDB ID: 1POD^[86]) entsprechend eingefärbt. Die typischen $(\beta/\alpha)_8$ -TIM-barrel sind dunkelrot (α -Helix) und dunkelblau (β -Faltblatt) gefärbt. Die Zink-Subdomäne ist hell- (α -Helix) bzw. dunkelgrün (β -Faltblatt) gefärbt. Die β 3- α 3-Insertion und das antiparallele dreisträngige β -Faltblatt sind hellblau gefärbt.

1. Einleitung und Motivation

Allerdings bildet sich diese dimere Struktur ebenfalls im tRNA-*Stem/loop* gebundenem Komplex aus, in dem die zweizählige Symmetrie des Enzyms nicht durch die Kristallpackung vorgegeben wird. So bleibt die homodimere Form in Komplexstrukturen mit dem tRNA-Substrat erhalten, auch wenn sich die kristallographische Raumgruppe ändert und die Lage auf einer zweizähligen Drehachse entfällt (Raumgruppe *I*4; PDB IDs: 1Q2S and 1Q2R)^[16].

In kürzlich publizierten Arbeiten wurde gezeigt, dass die Dimerstabilität wesentlich von den Strukturelementen des $\beta 1\alpha 1$ -*Loops* und einem *Hotspot*, bestehend aus vier aromatischen Aminosäuren (Trp326, Tyr330, His333 und Phe92'), geprägt ist (**Kapitel 3 & 7**)^[15, 25-27].

In einer Arbeit von Immekus *et al.* (2013)^[27], als auch in den **Kapiteln 3 & 7** der vorliegenden Arbeit, wird im Detail beschrieben, wie kompetitive Inhibitoren in dem aktiven Zentrum binden und durch allosterische Wechselwirkungen die genannten Strukturelemente und damit die Dimerstabilität beeinträchtigen. Zwar bleibt durch Bindung der Liganden die dimere Form der TGT in der Kristallstruktur weitgehend erhalten, nanoESI-MS Messungen zeigen allerdings, dass die TGT-Monomerkonzentration aufgrund der Ligandbindung in der Gasphase erhöht wird. In drei Fällen konnte aufgrund von Ligandbindung, in der vorliegenden Arbeit beschrieben, eine alternative *gedrehte* dimere Form der TGT festgestellt werden, bei der eine physiologische Funktion nicht ausgeschlossen werden kann (**Kapitel 3 & 7**).

Durch die Komplexstrukturen mit dem tRNA-Substrat und nativer Massenspektroskopie konnte gezeigt werden, dass die tRNA und das TGT-Dimer in einem Verhältnis von 1:1 binden (**Abbildung 1.7b**)^[15]. Hierbei bindet das aktive Zentrum eines TGT-Monomers die tRNA und führt den Basenaustausch durch, während das zweite TGT-Monomer den Dimer-tRNA-Komplex über Wechselwirkungen des $\beta E\beta F$ -*Loops* (Teil der $\beta 3$ - $\alpha 3$ -Insertion) mit der tRNA stabilisiert^[15-17].

Sequenzvergleiche zwischen verschiedenen prokaryotischen Spezies zeigen weiterhin, dass die an der Bildung des konventionellen Dimer-*Interface* von *Z. mobilis* TGT beteiligten Reste auch in anderen Spezies konserviert sind^[17].

1. Einleitung und Motivation

1.7.3 Aktives Zentrum

Das aktive Zentrum der *Z. mobilis* TGT befindet sich im Bereich der β -Stränge des C-Terminus des TIM-barrel Motivs und akzeptiert tRNA-Moleküle mit der Sequenz U₃₃G₃₄U₃₅ als Substrat^[68, 88]. Ein breiter Kanal der TGT erkennt das Phosphat-Rückgrat der tRNA und nimmt dieses auf. Bei der TGT können drei Haupttaschen identifiziert werden.

1. Die Guanin-34/preQ₁-Tasche, bei der die oben beschriebene Basenaustauschreaktion stattfindet. Die Purinbasen werden dort über Wasserstoffbrücken zu Asp102, Asp156, Gln203, Gly230, Leu231 und Ala232 erkannt (**Abbildung 1.7c**). Met260 und Tyr106 wechselwirken mit dem π -System der aromatischen Substrate. Tyr106 ist hierbei der einzige Rest des aktiven Zentrums, welcher sich zwischen *Z. mobilis* und *S. flexneri* TGT im aktiven Zentrum unterscheidet^[89]. Bei *S. flexneri* ist an dieser Position ein Phenylalanin zu finden. Leu231 und Ala232 können über eine *induced-fit* Adaption, die mit einem Umklappen der Peptidbindung einhergeht, die H-Brückendonor- bzw. Akzeptoreigenschaften der Guanin-34/preQ₁-Tasche verändern^[86] (**Abbildung 1.5**).

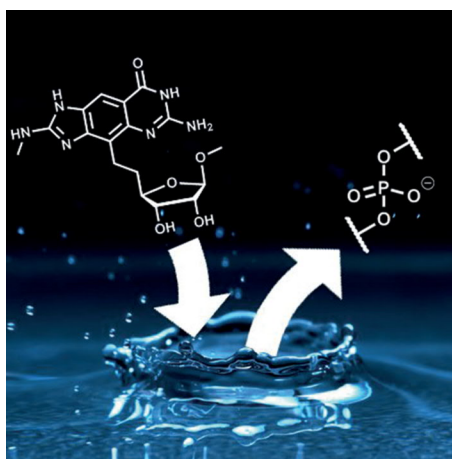
2. Die Ribose-33/Uracil-33-Tasche ist eine Lösungsmittel-exponierte schalenförmige Bindetasche, die von den Resten Ala232, Gly261 bis Lys264, Asp267, Cys281 bis Leu283 und Arg286 gebildet wird.

3. Die Ribose-34/Phosphat-35-Tasche kann als tief vergrabene Tasche beschrieben werden, bei der die Reste Val282, Leu68 und Val45 einen hydrophoben Boden bilden. Die Reste Thr47, Asn70 und Gln107 bilden den anderen Teil dieser Tasche, während Asp280 und Asp102 einen hydrophilen Eingang zu diesem Bereich formen.

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

2.1 Vorwort

Dieses Kapitel basiert auf dem Artikel und der zugehörigen Supporting Information „Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)“ von Luzi J. Barandun*, Frederik R. Ehrmann*, Daniel Zimmerli, Florian Immekus, Maude Giroud, Claudio Grünenfelder, W. Bernd Schweizer, Bruno Bernet, Michael Betz, Andreas Heine, Gerhard Klebe, und François Diederich (*These authors contributed equally)^[1]. Publiziert in *Chem. Eur.J.* 2015^[1]. Der Beitrag des Autors der vorliegenden Arbeit lag bei der Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT, Bestimmungen der kinetischen Inhibitionskonstanten durch den Radioaktivassay, ITC-Messungen zum Erhalt von Bindungsaffinitäten, als auch röntgenkristallographische Untersuchungen und wesentliche Beiträge zur Erstellung des Manuskripts.



^[1] Reprinted and adapted with permission from *Chem. Eur.J.* **2015**, **21**, 126-135.
Copyright 2016 John Wiley & Sons, Inc.

2.2 Abstract

The enzyme tRNA-guanine transglycosylase has been identified as a drug target for the foodborne illness shigellosis. A key challenge in structure-based design for this enzyme is the filling of the polar ribose-34 pocket. Herein, we describe a novel series of ligands consisting of furanoside-appended *lin*-benzoguanines. They were designed to replace a conserved water cluster and differ by the functional groups at C(2) and C(3) of the furanosyl moiety being either OH or OMe. The unfavorable desolvation of Asp102 and Asp280, which are located close to the ribose-34 pocket, had a significant impact on binding affinity. While the enzyme has tRNA as its natural substrate, X-ray co-crystal structures revealed that the furanosyl moieties of the ligands are not accommodated in the tRNA ribose-34 site, but at the location of the adjacent phosphate group. A remarkable similarity of the position of the oxygen atoms in these two structures suggests furanosides as a potential phosphate isoster.

2.3 Introduction

Filling polar binding pockets of an enzyme by a ligand is a difficult task in medicinal chemistry and structure-based drug design^[90]. In particular, phosphate binding sites^[91], which are present in many classes of enzymes, such as kinases and phosphatases^[92], are frequently targeted for improving potency and/or selectivity of a drug lead compound. Thereby, the understanding of replacing water molecules in the pocket of the apoenzyme is a key challenge^[93-101], and several approaches towards the consideration of water replacement in structure-based drug design and molecular docking have been developed^[102-109].

Herein, we present a new approach to the filling of a polar binding pocket in the enzyme tRNA-guanine transglycosylase (TGT; EC 2.4.2.29). It has been shown that TGT is essential in the development of the pathogenicity of *Shigella* bacteria^[66, 89], which cause the severe inflammatory bowel disease shigellosis and over one million lethal cases per year^[28, 31, 32, 110, 111]. Bacterial TGT is involved in the modification of tRNA and catalyzes the exchange of guanine by preQ₁ (7-aminomethyl-7-deazaguanine)^[85, 112]. Three major pockets are found in the active site of *Zymomonas mobilis* TGT: the central guanine/preQ₁ binding site, where the base-exchange reaction takes place, and the ribose-33 and ribose-34 pockets, where the tRNA backbone is accommodated (**Figure 1.7c**)^[16]. We have introduced 2-amino-*lin*-benzoguanines (such as **2.1**; IUPAC: 6-amino-2-(methylamino)imidazo-[4,5g]quinazolin-8(7H)-one) as central ligand scaffold that binds to the guanine/preQ₁ binding site (**Figure 2.1**)^[113, 114].

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

Derivatization at H₂N-C(2) and/or C(4) allowed us to target the ribose-33 pocket (see also **Chapter 6**)^[12, 115], the ribose-34 pocket (see also **Chapter 3 & 7**)^[13, 14], or both ribose pockets simultaneously^[116]. Furthermore, we have used ligands based on this scaffold for the modulation of the protein–protein interaction in homo-dimeric TGT (**Chapter 3 & 7**)^[15, 27], and studied the thermodynamic profile of ligand binding by isothermal titration calorimetry (ITC) (**Chapter 3 & 6**)^[117-119].

In the presence of a ligand in the guanine/preQ₄ binding site, the uncomplexed polar ribose-34 pocket is solvated by a highly conserved water cluster, which consists of five water molecules (**W**₁–**W**₅; see X-ray crystal structure in **Figure 2.1b** and Supporting Information Figure S1^[1]), with water molecule **W**₆ connecting the cluster to the solvent-exposed ribose-33 pocket^[13]. Displacing these water molecules, which solvate the side chains of the aspartates Asp102 and Asp280, by an apolar substituent (compound **2.2**) led to an unfavorable desolvation of the ribose-34 pocket, which was manifested in the weaker binding affinity ($K_i = 235 \pm 50$ nM) compared to the 4-unsubstituted analogue **2.1** ($K_i = 58 \pm 36$ nM). Parts of this water cluster were displaced by the polar substituents of ethanol **2.3** ($K_i = 97 \pm 5$ nM; PDB ID: 3E0U^[13]) or protonated amine **2.4** ($K_i = 55 \pm 3$ nM; PDB code 3GC5^[13]), but without gaining binding affinity. Only by further expanding the substituent into an apolar groove, shaped by Val45, Val282, and Leu68, was it possible to improve the binding affinity (e.g. compound **2.5**; $K_i = 4 \pm 2$ nM; PDB code: 3EOS^[13])^[14]. These findings were supported by molecular dynamics simulations, which identified nine water binding sites in the ribose-34 pocket, whereby only two of them were found to be favorable for displacement by an apolar ligand^[120]. Although the *lin*-benzoguanine derivatives are very potent ligands, their physicochemical properties are not optimal—in particular their low solubility in both water and organic solvents is a problem for synthesis, biological assays, and potential administration as a drug^[114]. This prompted us to investigate in the current study furanoside-based substituents for the displacement of the water cluster in the ribose-34 pocket (compounds **2.6a–c**; **Table 2.1**). The hydroxy groups may replace water molecules solvating the polar residues Asp102 and Asp280, but do not introduce an additional charge into the inhibitors, unlike the ethylammonium linker in compounds **2.4** and **2.5**. Since the furanosides are not linked by a N-glycosidic bond to the *lin*-benzoguanine scaffold, they are expected to be stable towards acidic or enzymatic depurination. Although several groups have analyzed the role of water molecules in carbohydrate–protein interactions^[121-126], furanosides and pyranosides are rarely used in structure-based drug design.

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended lin-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

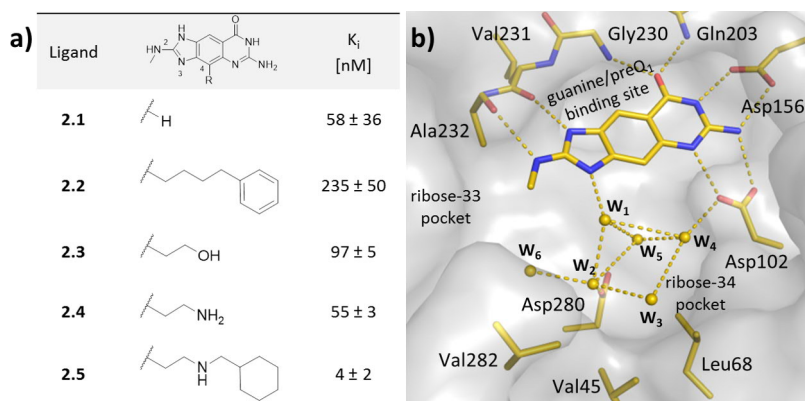
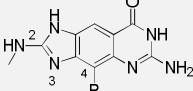
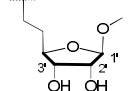
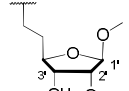
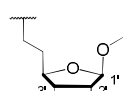


Figure 2.1. **a)** Structure and inhibition constants K_i of **2.1**^[12] and **2.2** – **2.5**^[14]. **b)** X-ray crystal structure of *Z. mobilis* TGT soaked with **2.1** (1.49 Å resolution, PDB ID: 4PUK^[118]). Color code: C yellow, O red, N blue, enzyme surface gray. Selected water molecules are shown as yellow spheres and labeled as **W**₁ – **W**₆. Hydrogen bonds are shown as dashed lines (heavy atom distances between 2.6 and 3.6 Å). These characteristics apply to all figures unless otherwise stated.

2.4 Results and Discussion

Table 2.1. Binding affinities, $\text{clog}D_{7.4}$, and $\text{clog}P$ values.

Ligand		$K_i^{[a]}$ [nM]	$K_d^{[b]}$ [nM]	$\text{clog}D_{7.4}^{[c]}$	$\text{clog}P^{[d]}$
β - 2.6a		217 ± 81	288 ± 55	- 1.5	- 1.3
α/β - 2.6b 15:85		286 ± 16	276 ± 69	- 1.1	- 0.9
β - 2.6c		353 ± 106	n.b. ^[e]	- 1.5	- 1.2

^[a]Inhibition constant measured by a radioactive assay. K_i values are mean values over at least four measurements. ^[b]Dissociation constant measured by ITC (see **Chapter 11**, section **11.6.2**). K_d values are mean values over at least five measurements. ^[c]Logarithmic distribution coefficient for octanol/water at pH 7.4. ^[d]Logarithmic partition coefficient for octanol/water. Both values were calculated using ACD/Labs software^[127]. ^[e]Not determined due to shape of curve.

2.4.1 Synthesis and Conformational analysis

The synthesis of pure β -**2.6a** and β -**2.6c**, and an enriched sample of α/β -**2.6b** (15:85) as well as the conformational analysis of the furanose ring are described in the publication and Supporting Information corresponding to **Chapter 2** (Barandun *et al.* (2015)^[1]).

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

2.4.2 Binding affinities

Compounds **2.6a–c** are readily water-soluble, which facilitated the assays of their biological activities. The binding affinities of the inhibitors were measured by a radioactive assay, giving K_i , and by ITC, giving K_d (for a description of both assays, see **Chapter 11.6**)^[89, 113, 117, 119]. Both assays gave comparable K_i and K_d values in the range of 217 – 353 nM (**Table 2.1**). We recently found for other *lin*-benzoguanine-derived ligands that both K_i and K_d values are in very good agreement, in contrast to the findings for *lin*-benzohypoxanthines, lacking the exocyclic NH₂ group, for which the thermodynamic dissociation constants are much lower than the inhibitory constants (for a detailed discussion, see Neeb *et al.* (2014)^[119]). Compared to ethanol **2.3** (**Figure 2.1a**), the furanoside-based inhibitors have weaker affinities by a factor of about 2–3. While losing some affinity compared to the previous substituted ligands, the ribose derivatives **2.6a–c** feature the advantage of much enhanced water solubility, which is essential for achieving solubility of the drug in blood. The hydrophilicity of the inhibitors was estimated using ACD/Labs software^[127], which was shown to predict $\text{clog}P$ values with a root mean squared error of 0.50 up to 1.28^[128]. Although the predicted values for the *lin*-benzoguanines are close to each other within the error range, a plausible trend is observed comparing their relative hydrophilicities. The ribose derivatives **2.6a–c** had a reduced hydrophilicity ($\text{clog}D_{7.4}$ of -1.1 to -1.5) as compared to the protonated ammonium compound derived from **2.4** (-2.5), but a higher hydrophilicity than the 4-unsubstituted analogue **2.1** (-0.3) or the cyclohexylmethylammonium derivative from **2.5** (-0.2). Maintaining a low hydrophilicity of a drug compound is crucial for membrane permeability and, consequently, for its efficacy and good retention in the body^[129].

2.4.3 X-ray co-crystal structures

For all ligands β -**2.6a**, β -**2.6b**, and β -**2.6c**, highly resolved co-crystal structures with *Z. mobilis* TGT (resolutions 1.17 – 1.41 Å; TGT·**2.6a**_{co}^{C2}, TGT·**2.6b**_{co}^{C2} and TGT·**2.6c**_{co}^{C2}) were obtained (**Table 12.2**). Although a 15:85 anomeric mixture of α/β -**2.6a** was co-crystallized with *Z. mobilis* TGT, only the β -anomer was bound suggesting a high preference over the α -anomer. The structures TGT·**2.6a**_{co}^{C2} and TGT·**2.6c**_{co}^{C2} are shown in **Figure 2.2a,b**, respectively, while TGT·**2.6b**_{co}^{C2} is depicted in Figure S2 in the Supporting Information^[1]. In all three structures, the *lin*-benzoguanine core is accommodated in the guanine/preQ₁ binding site forming the same interactions as previously observed for **2.1**^[13, 15, 27, 115-119]. The ligands form an array of hydrogen bonds to the side chains of Asp102, Asp156, and Gln203 and to the peptide backbone of Gly230, Leu231, and Ala232 (**Figure 2.2a,b**, Figure S2 in the Supporting Information^[1]).

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended lin-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

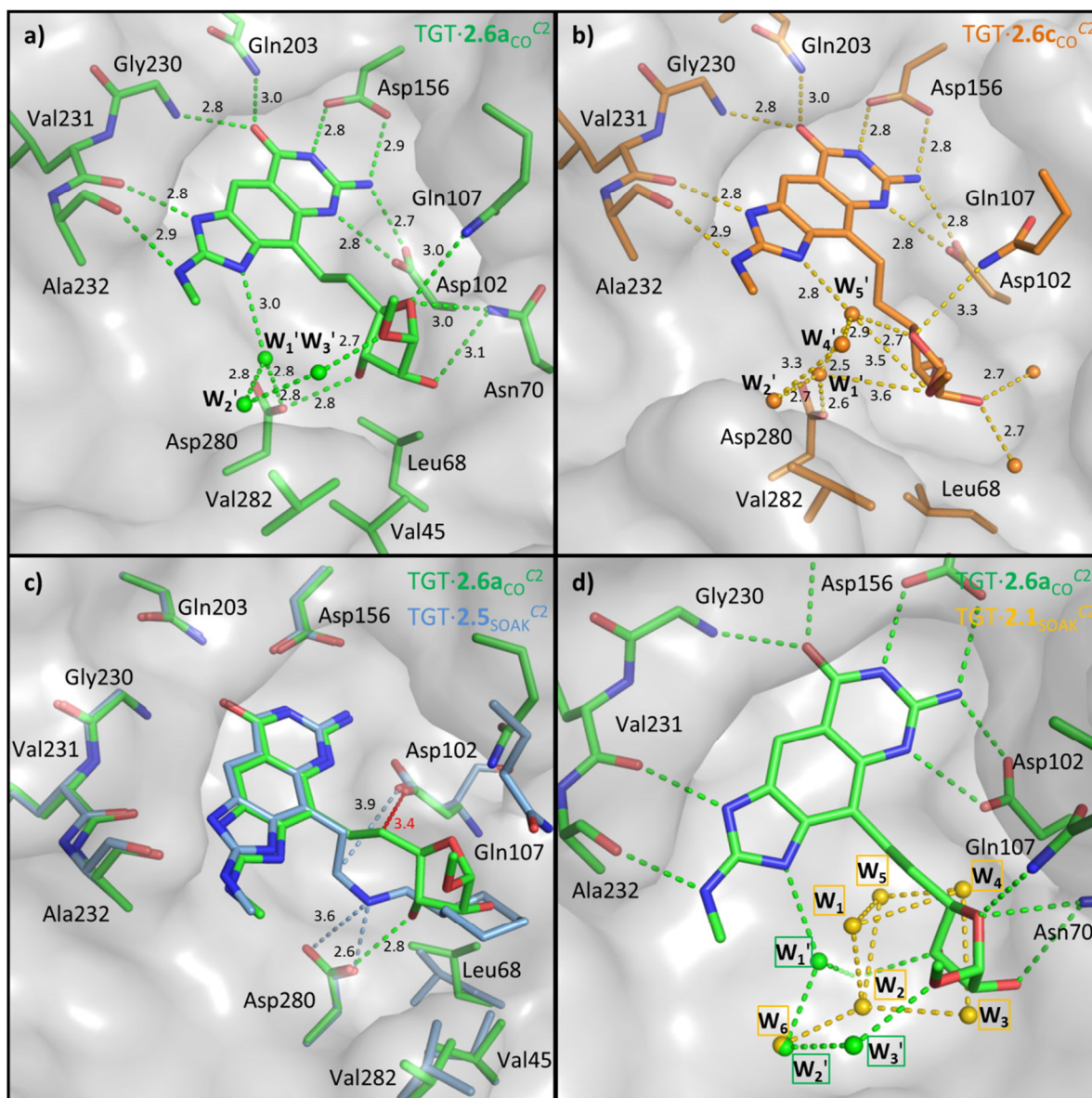


Figure 2.2. Active site of **a)** TGT-2.6a_{CO}^{C2} (C green, 1.41 Å resolution, PDB ID: 4LEQ) and **b)** TGT-2.6c_{CO}^{C2} (C orange, 1.32 Å resolution, PDB ID: 4KWO). **c)** Positions of the ethanediyl linkers of **2.5** (C light blue, PDB ID: 3EOS^[13]) and **β-2.6a**. A close unfavorable contact between the linker and Asp102 is shown as a red dashed line. **d)** Comparison of the water clusters in TGT-2.6a_{CO}^{C2} (**W**₁['], **W**₂['], and **W**₃['], shown as green spheres) and TGT-2.1_{SOAK}^{C2} (**W**₁–**W**₆, shown as yellow spheres; PDB ID: 4PUK^[118]). Distances are given in Å.

The co-crystal structure with **β-2.6a** (TGT-2.6a_{CO}^{C2}; PDB code: 4LEQ, **Figure 2.2a**) shows the furanosyl moiety in the ribose-34 pocket in an *E*₂ envelope conformation with *P*=344° and *φ*_m=44°. It undergoes hydrogen bonding with Asn70, Gln107, and Asp280. Only one hydrogen bond from HO-C(3) of the ribofuranosyl unit is formed to Asp280.

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

From the original five-water cluster (**Figure 2.1b**), three water molecules (**W₃**, **W₄**, **W₅**) are displaced by **β-2.6a**, two water molecules (**W₁'** and **W₃'**; green) are at a slightly altered position (**Figure 2.2d** and Figure S3 in the Supporting Information^[1]), and water molecule **W₂'**, connecting the cluster to the solvent-exposed ribose-33 pocket, remained at the same position. The methoxy group at C(2) accepts a hydrogen bond from **W₃'**.

The ethanediyl linker, which connects the furanosyl moiety to the *lin*-benzoguanine core of **β-2.6a–c**, is oriented away from the bottom of the ribose-34 pocket. This is in contrast to our previous C(4) ethylamino-substituted *lin*-benzoguanines, in which the ethanediyl linker is oriented towards the bottom of the pocket allowing formation of a hydrogen-bond from the ammonium center (compounds **2.4** and **2.5**) to Asp280 (**Figure 2.2c**; PDB ID: 3EOS^[13]). In addition, the orientation towards the bottom of the pocket avoids repulsive interactions with Asp102 (e.g. for **2.5**, $d(\text{C}_{\text{ethyl}} \cdots \text{O}_{\text{Asp102}}) = 3.9 \text{ \AA}$), whereas the orientation towards the top in **β-2.6a** brings the ethanediyl linker into unfavorable proximity of Asp102 ($d(\text{C}_{\text{ethyl}} \cdots \text{O}_{\text{Asp102}}) = 3.4 \text{ \AA}$). Furthermore, this conformation has also an effect on the orientation of side chain of Tyr106 (not shown in **Figure 2.2**; see Figure S4 in the Supporting Information^[1]), which together with the side chain of Met260 forms a sandwich incorporating the tricyclic *lin*-benzoguanine core. When the ethanediyl linker is oriented towards the top of the pocket, Tyr106 is no longer parallel to the *lin*-benzoguanine core, but tilted by 50° and undergoes a C-H \cdots π-interaction with the linker.

The superimposition of the crystal structures of TGT in complex with **2.5** (PDB ID: 3EOS^[13]) and **β-2.6a** (TGT·**2.6a**_{co}^{C2}) shows that the furanosyl moiety does not extend into the hydrophobic patch formed by Val45, Val282, and Leu268 (**Figure 2.2c**). The O-C(2) bond of **β-2.6a**, however, is ideally positioned to direct a lipophilic ether substituent into this patch for additional gain in binding affinity (compare **2.4** and **2.5**, **Figure 2.1a**).

A similar situation is found for TGT·**2.6b**_{co}^{C2} (Figure S2 in the Supporting Information^[1]; PDB code: 4LBU). The enzyme and the ligand, in particular the furanosyl moiety (*E*₂ envelope conformation with $P = 350^\circ$ and $\varphi_m = 44^\circ$), adopt a similar geometry to that seen in TGT·**2.6a**_{co}^{C2}. The additional methyl group at O-C(2) points towards the hydrophobic groove of the ribose-34 pocket, consisting of Val45, Leu68, and Val282, confirming the opportunity for filling this pocket with larger, more complementary lipophilic groups and concomitant gain in binding affinity. The positions of the two residual water molecules of the initial cluster also comply to TGT·**2.6a**_{co}^{C2}, although **W₂'** is not observed.

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

The X-ray co-crystal structure of *Z. mobilis* TGT with β -**2.6c** (TGT·**2.6c**_{CO}^{C2}; PDB code: 4KWO, **Figure 2.2b**) shows a different orientation and conformation of the furanosyl moiety than β -**2.6a**. As a result of the additional methyl group at O-C(3), a hydrogen bond to Asp280 is no longer possible. Hence, the furanose ring moves away as compared to the complexes with β -**2.6a** (**Figure 2.2b**) and β -**2.6b** (Figure S2 in the Supporting Information^[1]), avoiding a clash between the highly polar Asp280 side chain and the methoxy group.

The furanose ring is no longer in the usual E_2 envelope conformation but in a less stable 0T_4 twist conformation with $P = 79^\circ$ and $\varphi_m = 39^\circ$. In this position, C(1)-O-C(4) forms a hydrogen bond to Gln107. In contrast to TGT·**2.6a**_{CO}^{C2} and TGT·**2.6b**_{CO}^{C2}, the ethanediyl linker of β -**2.6c** (in TGT·**2.6c**_{CO}^{C2}) is oriented towards the bottom of the pocket. In this position, Tyr106 does not form a C-H $\cdots\pi$ interaction with the linker, but is oriented parallel to the *lin*-benzoguanine core. Furthermore, the downwards orientation of the ethanediyl group avoids repulsive interactions with Asp102. The water cluster in TGT·**2.6c**_{CO}^{C2} has an altered pattern and consists of four molecules. Water molecule **W**₂', which corresponds to **W**₆ in the original five-water cluster (**Figure 2.1b**) is not displaced by the ligand as in TGT·**2.6a**_{CO}^{C2} and TGT·**2.6b**_{CO}^{C2}. The water network comprises **W**₁', which is also seen in TGT·**2.6a**_{CO}^{C2} and TGT·**2.6b**_{CO}^{C2}, in addition to **W**₄' and **W**₅'.

The structural insights from the three co-crystal structures explain the weaker binding affinity compared to the 4-unsubstituted *lin*-benzoguanine **2.1** ($K_i = 58 \pm 36$ nM) and inhibitor **2.5** ($K_i = 4 \pm 2$ nM; **Figure 2.1a**). In the case of the uncomplexed ribose-34 pocket in the co-crystal structure with **2.1**, Asp280 is optimally solvated by a water cluster. In the crystal structure in complex with high-affinity ligand **2.5**, Asp280 interacts with the ammonium center in the linker by forming two charge-assisted hydrogen bonds. In contrast, the furanosyl moieties of β -**2.6a** and β -**2.6b** only form one hydrogen bond from HO-C(3) to the anionic Asp280 side chain and reduce the solvation of the ribose-34 pocket by displacing three water molecules. Ethanol **2.3** and ammonium derivative **2.4** are better binders, as they leave a better solvated Asp side chain (c.f. Figure S5 in the Supporting Information^[1]). The furanosyl moiety of β -**2.6c** cannot form a hydrogen bond to the side chain of Asp280 due to the methyl group at O-C(3). A second negative influence on the binding affinity of the furanosides is the repulsive interaction with Asp102, which comes into unfavorable proximity of the ethanediyl linker of β -**2.6a** and α/β -**2.6b**. Inhibitor β -**2.6c** avoids this penalty, but the furanose moiety has to adopt a ring conformation that is most likely higher in energy^[130]. Although all three furanosides form additional interactions to the enzyme—such as hydrogen bonds of HO-C(2) to Asn70 and from the cyclic ether O-atom to Gln107—the penalty of desolvation of Asp102 and Asp280 is not compensated.

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

2.4.4 Phosphate mimic

The natural substrate of TGT is tRNA, the phosphate backbone of which is recognized in the ribose pockets of the enzyme. The overlay of the X-ray crystal structures of *Z. mobilis* TGT in complex with a tRNA substrate and preQ₁ introduced at the wobble position-34 (PDB ID: 1Q2S^[16]) and TGT·**2.6a**_{CO}^{C2} is shown in **Figure 2.3**.

The pyrimidone moiety of the *lin*-benzoguanine penetrates deeper into the guanine/preQ₁ binding site than the same moiety of tRNA-bound preQ₁ (about 0.8 Å based on the pyrimidone core). A striking difference is that the complexed tRNA does not form a hydrogen bond to Asp280, which is involved in the catalytic cycle of the enzyme^[16, 131]. The ethanediyl linker of the synthetic ligand spans the ribose-34 ring of the tRNA to which preQ₁ is attached. This places the furanosyl moiety of **β-2.6a** into the position of the phosphate-34 group of the tRNA. For a detailed analysis of the two structures, it must be taken into consideration that the resolution of the X-ray crystal structure with the tRNA substrate is significantly lower (3.20 Å^[16]) compared to TGT·**2.6a**_{CO}^{C2} (1.41 Å). In addition, the measured atomic distances depend on the overlay of the structures (alignment was based on the amino acid residues in the guanine/preQ₁ binding site). Nevertheless, a qualitative comparison shows that the oxygen atom of the anomeric methoxy group of **β-2.6a** is at a similar position to O(δ) of the phosphate group of the tRNA ligand ($d[C(1)-O_{\beta-6a}\cdots O(\delta)_{tRNA}] = 1.2 \text{ Å}$; see **Figure 2.3b** for numbering of the atoms). The HO-C(2) moiety of **β-2.6a** is next to O(γ) ($d[C(2)-O_{\beta-6a}\cdots O(\gamma)_{tRNA}] = 1.6 \text{ Å}$), while O(α) is located in between of HO-C(2) ($d[C(2)-O_{\beta-6a}\cdots O(\alpha)_{tRNA}] = 1.5 \text{ Å}$) and HO-C(3) ($d[C(3)-O_{\beta-6a}\cdots O(\alpha)_{tRNA}] = 1.7 \text{ Å}$). The ether oxygen C(4)-O is near O(β) of the phosphate group ($d[C(4)-O_{\beta-6a}\cdots O(\beta)_{tRNA}] = 1.9 \text{ Å}$). In addition, the water molecules **W**₁' and **W**₂' in TGT·**2.6a**_{CO}^{C2} are in proximity of the oxygen atoms of the second phosphate group pointing into the ribose-33 pocket ($d[O_{W1'}\cdots O(\gamma')_{tRNA}] = 1.3 \text{ Å}$ and $[O_{W2'}\cdots O(\delta')_{tRNA}] = 0.5 \text{ Å}$). A similar situation is found for compound **β-2.6b** (Figure S6a in the Supporting Information^[1]). In contrast, no similarity to the phosphate group is apparent for ligand **β-2.6c** (Figure S6b in the Supporting Information^[1]). Given the binding affinities of inhibitors **β-2.6a** and **β-2.6b** in the nanomolar range, the overlays in **Figure 2.3** and Figure S6a (Supporting Information^[1]) suggest that furanosides might be suitable groups to target phosphate binding sites.

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

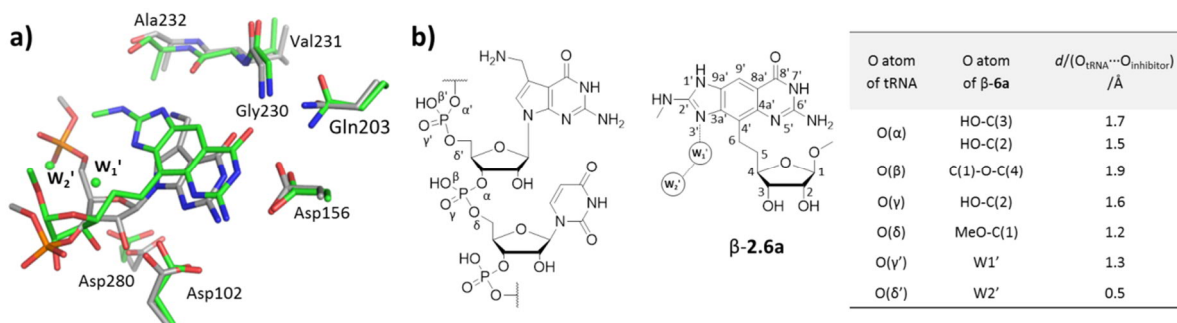


Figure 2.3. **a)** Comparison of the X-ray crystal structures of *Z. mobilis* TGT in complex with a preQ₁-tRNA substrate (C gray, 3.20 Å resolution, PDB ID: 1Q2S^[16]) and TGT·**2.6a**_{CO}^{C2} (PDB code: 4LEQ, C green). **b)** Comparison of the positions of the oxygen atoms of the phosphate group with the oxygen atoms of furanosyl moiety.

The filling of these polar pockets is a very challenging task in medicinal chemistry and is often only achieved by charged functional groups that impair membrane permeability^[132-134]. In this work, we show the potential of furanoside-based ligands to fill the phosphate binding site in *Z. mobilis* TGT. Such substituents have no charge, and the furanosyl moiety increases the water solubility and should not suffer from fast metabolism as it is C-C linked and not C-N linked as in natural nucleotides. Potent neutral phosphate isosters are rare, and this has hampered in particular the development of ligands for the active site of phosphatases; therefore, our future work will focus on validating the hypothesis that furanosides, such as introduced here, have more general phosphate isosteric character.

2.5 Conclusion

Herein, we describe a novel series of *lin*-benzoguanines that target the polar ribose-34 pocket of *Z. mobilis* TGT with a furanosyl moiety. The preparation involved a new cyclization strategy for the *lin*-benzoguanine core and the highly challenging separation of the anomeric mixtures by HPLC on a chiral stationary phase. While our previous *lin*-benzoguanine-based inhibitors suffered from poor water solubility, the furanosyl moiety renders **2.6a–c** freely water soluble. The new compounds had K_i values in the range of 217 – 353 nM, which makes them weaker inhibitors than ethanol **2.3** and ethylamine **2.4** by a factor of 4 – 6. Based on the analysis of X-ray co-crystal structures, the decrease in binding affinity is due to unfavorable desolvation of Asp102 and Asp280. Although the furanosyl moiety establishes several additional interactions to the enzyme, the removal of three of the five water molecules in the original five-water cluster cannot be compensated. This cluster solvates the ribose-34 pocket in the presence of ligand **2.1**, which does not penetrate into the pocket.

2. Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-Appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

However, the crystal structures also point to the opportunity for regaining binding affinity through extension of the ligands by etherification of HO-C(2) with residues complementary to the hydrophobic patch shaped by Val45, Val282, and Leu68. The comparison of the binding affinities of **2.4** and **2.5** shows that much affinity can be gained from proper occupation of this hydrophobic subsite near the ribose-34 pocket. The comparison of the X-ray co-crystal structures in complex with the furanosyl *lin*-benzoguanines with a structure with the tRNA-preQ₁ substrate shows an intriguing finding. The furanosyl moiety is not occupying the ribose-34-recognizing area of the enzyme active pocket, but the phosphate-34 binding site. Thereby, the positions of the oxygen atoms of the furanoside resemble the positions of the oxygen atoms in the phosphodiester. This gives rise to the hypothesis that furanosides might be potential surrogates for targeting phosphate binding sites.

The further decoration of the furanoside to properly fill the hydrophobic patch and reach the low nanomolar activity range and the validation of furanosides and related sugar derivatives as phosphate isosters are currently pursued in our laboratories.

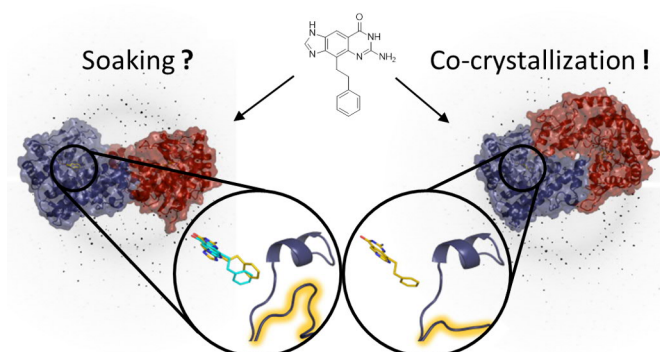
2.6 Experimental Section

Detailed information about experimental details for the syntheses of compounds **2.6a-c**, NMR spectra and conformational analysis of the furanosides can be found in the publication and Supporting Information corresponding to **Chapter 2** (Barandun *et al.* (2015)^[1]). Details about TGT expression, purification, radioactive assay, ITC, and crystallization protocols can be found in **Chapter 11**.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

3.1 Vorwort

Das folgende Kapitel basiert auf einem Manuskript und der zugehörigen Supporting Information, das zur Vorlage für *ACS Chem. Biol.* erstellt wurde. Mit dem Titel „Soaking versus Co-Crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding“ wurde das Projekt von folgenden Autoren erarbeitet: Frederik R. Ehrmann, Johann Stojko, Alexander Metz, François Debaene, Luzi J. Barandun, Andreas Heine, François Diederich, Sarah Cianferani, Klaus Reuter und Gerhard Klebe. Der Beitrag des Autors der vorliegenden Arbeit lag bei der Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT, den Bestimmungen der kinetischen Inhibitionskonstanten durch den Radioaktivassay, ITC-Messungen zum Erhalt von Bindungsaffinitäten und thermodynamischen Signaturen, röntgenkristallographische Untersuchungen und der Erstellung des Manuskripts.



3.2 Abstract

For the efficient pathogenesis of *Shigella*, the causative agent of bacillary dysentery, tRNA-guanine transglycosylase (TGT) is mandatory. TGT performs a post-transcriptional modification of tRNAs in the anticodon loop, which takes impact on virulence development. This suggests TGT as a putative target for selective anti-shigellosis drug therapy. Since bacterial TGT is only functional as homodimer, its activity can be inhibited either by blocking its active site or preventing its dimerization. Recently, we discovered that in some crystal structures obtained by soaking the full conformational adaptation upon ligand binding as most likely exhibited in solution is not displayed. Thus, soaked structures may be misleading and even suggest false binding modes. Accordingly, we re-investigated these complexes by co-crystallization. The obtained structures revealed large conformational rearrangements not visible in the soaked complexes. They result from crucial spatial perturbations in the ribose-34/phosphate-35 recognition pocket and, consequently, a loop-helix motif required to prevent the access of water molecules into the dimer interface loses its geometric integrity. Thermodynamic profiles of ligand binding indicated favorable entropic contributions to complex formation when large conformational adaptations in the dimer interface are involved. Native MS titration experiments revealed the extent to which the homodimer was destabilized in the presence of each inhibitor. Unexpectedly, one ligand caused a complete rearrangement of subunit packing within the homodimer, which had never been observed in any other TGT crystal structure before. Likely, this twisted dimer is catalytically inactive and, therefore, suggests that stabilizing this non-productive subunit arrangement may be used as a further strategy to inhibit TGT.

3.3 Introduction

Bacterial tRNA-guanine transglycosylase (TGT; EC 2.4.2.29) catalyzes the exchange of the genetically encoded guanine-34 in the wobble position of tRNAs^{Asp,Asn,His,Tyr} by the premodified base preQ₁ (7-aminomethyl-7-deazaguanine)^[135].

At the level of tRNA, this base is then further modified to queuine^[81, 82]. In *Shigella* spp., the causative agents of bacillary dysentery, TGT function is essential for the efficient translation of *virF* mRNA encoding a transcriptional activator, which in turn is required for the expression of a large number of pathogenicity genes^[65]. Inactivation of the *tgt* gene results in a significantly weakened virulence phenotype suggesting TGT as a putative target for the rational design of anti-shigellosis compounds^[66, 67]. Bacillary dysentery or shigellosis is a severe diarrheal disease^[32] with approximately 150 million cases causing more than 70.000 fatalities per year^[31, 37].

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

It mainly occurs in developing countries with substandard hygiene and water supplies^[28], but recent reports have also shown increasing incidence in the USA^[35]. The emergence of multi-drug resistant *Shigella* strains makes the development of new selective anti-shigellosis compounds an serious need^[35, 42, 136].

Since the functional unit of bacterial TGT is a homodimer^[15-17], inhibition may not only be achieved *via* compounds blocking its active site but also *via* ligands interfering with dimer formation. In our studies, we use the well crystallizable TGT from *Zymomonas mobilis* as a substitute for TGT from *Shigella* spp. Both enzymes are highly similar and their active sites solely differ by a conservative Tyr106Phe replacement (*Z. mobilis* TGT numbering)^[89], which was shown to have no significant influence on ligand binding and catalysis^[86]. The active site of bacterial TGT comprises three sub-pockets, namely the guanine-34/preQ₁ binding site, where base exchange occurs, complemented by the adjacent ribose-34/phosphate-35 and ribose-33/uracil-33 recognition sites (**Figure 3.1**).

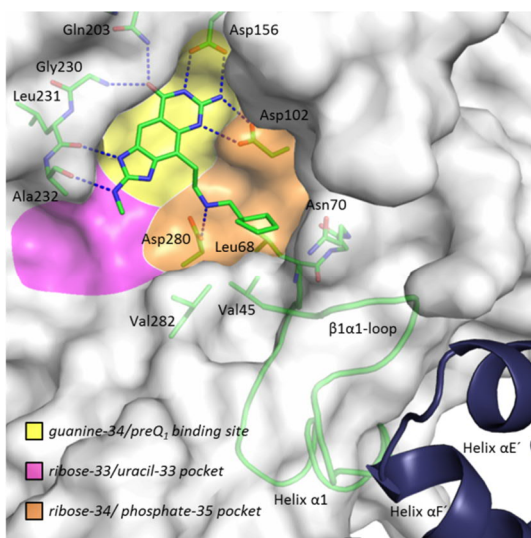


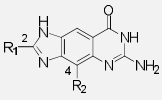






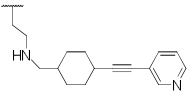





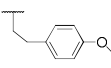

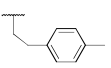


Figure 3.1. Overview of the active site, its different sub-pockets (yellow, orange, magenta), and part of the second monomer. Co-crystal structure of TGT with inhibitor **3.5** (TGT·**3.5**_{CO}^{C2}). The protein is shown as transparent solvent accessible surface and the *loop-helix motif* as cartoon. Color code: C green, O red, N blue. **3.5** and selected residues are displayed as sticks. For the sake of clarity, residues Tyr106 to Leu111 are not shown. Val45, Leu68 and Val282 form the *hydrophobic floor* of the ribose-34/phosphate-35 pocket (orange). Selected portions of the second monomer of the homodimer are shown as blue cartoon. Blue dashed lines indicate H-bonds from **3.5** with the protein (2.7 – 2.9 Å). These characteristics apply to all following figures unless otherwise stated.

In previous studies, we had characterized a number of TGT inhibitors, such as **3.1** – **3.9** in **Table 3.1**, which were all based on a *lin*-benzoguanine scaffold endowed with various substituents addressing the adjacent recognition pockets^[14, 15, 27, 114, 137]. While the *lin*-benzoguanine scaffold invariably occupies the guanine-34/preQ₁ binding site, its substituents reach into adjacent sub-pockets thereby leading to a broad range of TGT affinities.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Recently, we embarked on *lin*-benzoguanines substituted with different furanosides at position 4 (**Chapter 2**^[1]). These furanosides were aimed at displacing a conserved water cluster which, in the presence of the unsubstituted parent *lin*-benzoguanine scaffold, solvates the ribose-34/phosphate-35 pocket (R34/P35-pocket in the following). Among these inhibitors are ligands **3.2** (in **Chapter 2: 2.6a**) and **3.3** (in **Chapter 2: 2.6c**) (**Table 3.1**), which solely differ by a methyl group attached to the 3'-OH function of the furanoside in **3.3**. Fitting well into its active site, both ligands inhibit TGT at three-digit nanomolar inhibition constants K_i with the furanosides mimicking phosphate-35 of a bound tRNA substrate.

Table 3.1. Overview of TGT inhibitors, inhibition constants (K_i), and crystal structures.

Inhibitor			K_i [nM]	PDB entry	Complex·Inhib. protocol ^{space group[a]}	Resolution [Å]	Unit cell parameter			
	R ₁	R ₂					a [Å]	b [Å]	c [Å]	β [°]
3.1		H	58 ± 36 ^[12]	4PUK ^[118]	TGT· 3.1 _{SOAK} ^{C2}	1.49	90.8	65.0	71.0	96.3
3.2			217 ± 81 ^[1]	4LEQ ^[1]	TGT· 3.2 _{CO} ^{C2}	1.41	90.6	65.1	70.4	96.3
3.3			353 ± 106 ^[1]	5I09	TGT· 3.3 _{SOAK} ^{C2}	1.44	91.0	65.1	70.8	96.3
				4KWO ^[1]	TGT· 3.3 _{CO} ^{C2}	1.32	85.2	65.2	71.4	94.0
3.4			193 ± 41	4FSA ^[27]	TGT· 3.4 _{SOAK} ^{C2}	1.62	91.1	64.9	70.8	96.3
				4FR6 ^[27]	TGT· 3.4 _{CO} ^{C2}	1.59	84.8	64.8	71.4	93.0
3.5			2 ± 1 ^[14]	3GE7 ^[13]	TGT· 3.5 _{SOAK} ^{C2}	1.50	91.2	65.2	70.5	96.1
				5I00	TGT· 3.5 _{CO} ^{C2}	1.49	91.3	65.1	70.6	96.3
3.6			4 ± 2 ^[14]	3EOS ^[13]	TGT· 3.6 _{SOAK} ^{C2}	1.78	91.2	64.8	70.1	95.9
				5I02	TGT· 3.6 _{CO} ^{C2}	1.25	84.5	64.8	71.4	94.1
3.7			3700 ± 900 ^[137]	1Y5X ^[137]	TGT· 3.7 _{SOAK} ^{P2}	2.10	71.1	64.2	88.1	95.1
				5I06	TGT· 3.7 _{CO} ^{C2}	1.36	84.9	64.9	71.2	93.9
3.8			6900 ± 1700 ^[137]	1Y5W ^[137]	TGT· 3.8 _{SOAK} ^{C2}	1.58	90.9	65.3	70.0	96.0
				5I03	TGT· 3.8 _{CO} ^{C2}	1.73	85.1	64.6	71.0	93.6
3.9			1000 ± 300 ^[137]	1Y5V ^[137]	TGT· 3.9 _{SOAK} ^{C2}	1.58	90.6	64.9	70.1	95.8
				5I07	TGT· 3.9 _{CO} ^{P21}	1.89	69.1	78.9	85.2	109.0

[a] TGT·Inhib._{soak}^{space group} = soaked TGT structure of inhibitor **3.1** – **3.9**. TGT·Inhib._{co}^{space group} = TGT co-crystal structure of inhibitor **3.1** – **3.9**. Complexation of some inhibitors in co-crystal structures is accompanied by a reduction of the a-axis and β-angle or a change of the space group, which are highlighted in bold characters and underlined.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Surprisingly, co-crystallization of TGT with **3.3** (but not with **3.2**) led to crystals with the unit cell a-axis reduced by more than 5 Å and the β -angle reduced by about 2° compared to what is normally observed in *Z. mobilis* TGT crystals. The resulting crystal structure reveals that the changes of unit cell parameters are accompanied by an altered course of loop $\beta 1\alpha 1$ in TGT (**Figure 3.2a**). In addition, helix $\alpha 1$ is no longer crystallographically resolved. These structural elements, hereinafter referred to as *loop-helix motif*, usually shield a cluster of aromatic residues within the TGT homodimer interface from water access^[25-27]. While in our previous work we focused on the interactions of ligands **3.2** (in **Chapter 2: 2.6a**) and **3.3** (in **Chapter: 2 2.6c**) with active-site residues of bacterial TGT^[1], here we investigate their distinct effects on dimer interface architecture caused by the mere presence or absence of a sole methyl group at the furanoside 3'-OH function.

Similar structural changes of the *loop-helix motif* combined with a reduction of the a-axis and β -angle had been observed beforehand, namely in the crystal structures of TGT(Lys52Met) (PDB entry: 3HFY^[15]) and wild type TGT co-crystallized with inhibitor **3.4** (**Table 3.1**). The Lys52Met mutation had been introduced into TGT in order to impede dimer formation and, likewise, **3.4** had been designed to launch a rigid 3-pyridyl-ethynyl needle in the homodimer interface with the intention to destabilize it^[27]. Remarkably, the named conformational changes of TGT as well as changes in unit cell parameters did not appear when **3.4** was soaked into a pre-existing apo-TGT crystal (Figure S2). In this case, the dimer interface remains nearly unaffected by ligand binding but, instead, ligand **3.4** with its rigid 3-pyridyl-ethynyl needle adapts its conformation to the preformed protein packing within the crystal. This suggests that conformational changes within the protein as they are likely to occur upon ligand binding in solution may be hampered when ligand molecules are soaked into pre-existing crystals of apo-TGT. Accordingly, binding poses observed in TGT crystals which were soaked with ligands may not necessarily reflect the situation in solution but may suggest artificial, non-relevant binding modes.

In contrast to the spiking ligand **3.4**, the two closely related furanosides, **3.2** and **3.3**, had not been designed with the intention to disturb TGT dimer formation but to create high-affinity active site inhibitors. However, only the co-crystal structures of **3.2** and **3.3** in complex with TGT revealed their deviating influence on the dimer interface (**Figures 3.2a & 3.4a,b**). This unanticipated finding prompted us to reinvestigate a number of related *lin*-benzoguanine-based inhibitors (**3.5** to **3.9**; **Table 3.1**) which had been the objects of former studies and, due to their bulky substituents at position 4 of the heterocyclic scaffold (for labeling, see **Table 3.1**), might have potential effects on dimer interface stability as well^[12-14, 115, 137]. Similar to ligand **3.3**, these compounds had originally been designed with the purpose to inhibit the active site of TGT and, accordingly, had not initially been investigated with respect to any influence on dimer architecture.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Since all crystal structures of these ligands in complex with TGT had exclusively been determined by soaking the respective compound into a pre-existing apo-TGT crystal, any such effect most probably would have remained unnoticed (with the exception of ligand **3.7** that shows an effect on the TGT dimer interface even when soaked into a crystal of apo-TGT; see below). In the present study, we therefore prepared co-crystal structures of TGT with **3.5** to **3.9**, which were expected to uncover the influence of these ligands on dimer interface architecture, if there was any. In addition, we used native mass spectrometry (native MS) to study the impact of each compound on TGT-dimer stability in solution. Finally, we employed isothermal titration calorimetry (ITC) on a selected subset of ligands to determine binding constants and differences in the enthalpy/entropy signature for the deviating interface modulations.

Indeed, our study revealed further ligands exhibiting significant influence on dimer stability and architecture. The systematic comparison of co-crystallized and soaked TGT-ligand complexes provided further examples illustrating that adopted binding modes may depend on the applied crystallization protocol. Moreover, a totally unexpected effect was observed in the co-crystal structure of TGT in complex with **3.9**. Here, co-crystallization led to a novel crystal packing with a TGT dimer structure showing a monomer arrangement entirely different from that previously reported for bacterial TGTs. The formed *twisted dimer* provides the first example where ligand binding obviously induces a pronounced reorganization of dimer assembly. The impact of this surprising finding on structure-based drug design is discussed in detail.

3.4 Results & Discussion

3.4.1 Overview and Intention of Crystal structures

To gain insight into potential effects of **3.5** to **3.9** on TGT dimer formation and stability, we co-crystallized these ligands with *Z. mobilis* TGT and determined the crystal structures of the resulting complexes (TGT·**3.5-3.9**_{CO}^{C2/P21}). So far, all available structures of these complexes had been obtained by soaking the ligands into pre-existing apo-TGT crystals (TGT·**3.5-3.9**_{SOAK}^{C2/P2}). In addition, we determined the structure of TGT in complex with **3.3** after soaking it into a crystal of apo-TGT (TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}), since our initial structure of **3.3** bound to the enzyme had been gained *via* co-crystallization (TGT·**3.3**_{CO}^{C2}; in **Chapter 2**: TGT·**2.6**_{CO}^{C2}). **Table 3.1** lists resolution, space group and unit cell parameters of all crystal structures considered in this study including previously determined ones^[1, 13, 118, 137]. Detailed data statistics of the newly determined structures are presented in **Table 12.2**.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

All examined ligands are based on the parent *lin*-benzoguanine scaffold, which binds similarly to the enzyme in all structures. It is accommodated by the guanine-34/preQ₁ binding site where it is sandwiched between the side chains of Tyr106 and Met260, and forms a total of seven hydrogen bonds (H-bonds) to Asp102, Asp156, Gln203, Gly230 and Leu231 (**Figure 3.1**)^[12, 113]. In **3.1** to **3.6** the *lin*-benzoguanine contains a 2-methylamino substituent, which allows for a further H-bond to the main-chain carbonyl of Ala232. For the present study, however, this feature is of minor relevance.

3.4.2 Methylation of the Furanoside 3'-Hydroxyl Group Clearly Impacts the Architecture of the TGT Dimer Interface.

The co-crystal structures of **3.2** and **3.3** (TGT·**3.2**_{co}^{C2} and TGT·**3.3**_{co}^{C2}; in **Chapter 2**: TGT·**2.6a**_{co}^{C2} and TGT·**2.6c**_{co}^{C2}, respectively) had been published by us previously presenting a detailed analysis of the adopted binding poses (**Chapter 2**)^[1]. Both compounds bear a furanoside substituent at position 4, which solely differs in the absence (**3.2**) or presence (**3.3**) of a methyl group attached to the 3'-OH group of the furanoside (**Table 3.1**). The 4-substituents of both ligands occupy the R34/P35-pocket with the furanosides mimicking the 5'-phosphate group of nucleotide-35 of a bound tRNA substrate. Thereby, however, they adopt considerably divergent conformations (**Figure 3.2a**).

In TGT·**3.2**_{co}^{C2} the endocyclic furanoside oxygen accepts an H-bond from the Gln107 carboxamide (**Figure 3.3c**). Notably, compared to apo-TGT (PDB entry: 1POD^[86]; **Figure 3.3a**) and nearly all available ligand-bound TGT complexes, this residue is shifted, with the furanosyl ring of **3.2** being close to the position of Gln107 in the apo-protein. The displacement of Gln107 affects the orientation of helix α A comprising Gly105 to Leu111 (not shown). Asn70 is recruited into the abandoned space formerly occupied by Gln107 now donating an H-bond to the furanoside 2'-OH function *via* its side chain amide. In addition, the carboxylate group of Asp280 accepts an H-bond from the adjacent 3'-OH group while a water molecule donates an H-bond to the furanoside 1'-methoxy group. Residues Val45, Leu68, and Val282 forming the *hydrophobic floor* of the R34/P35-pocket as well as the *loop-helix motif* (loop β 1 α 1 plus helix α 1 = residues 47 to 55 plus 56 to 62) are not influenced by the binding of **3.2**.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

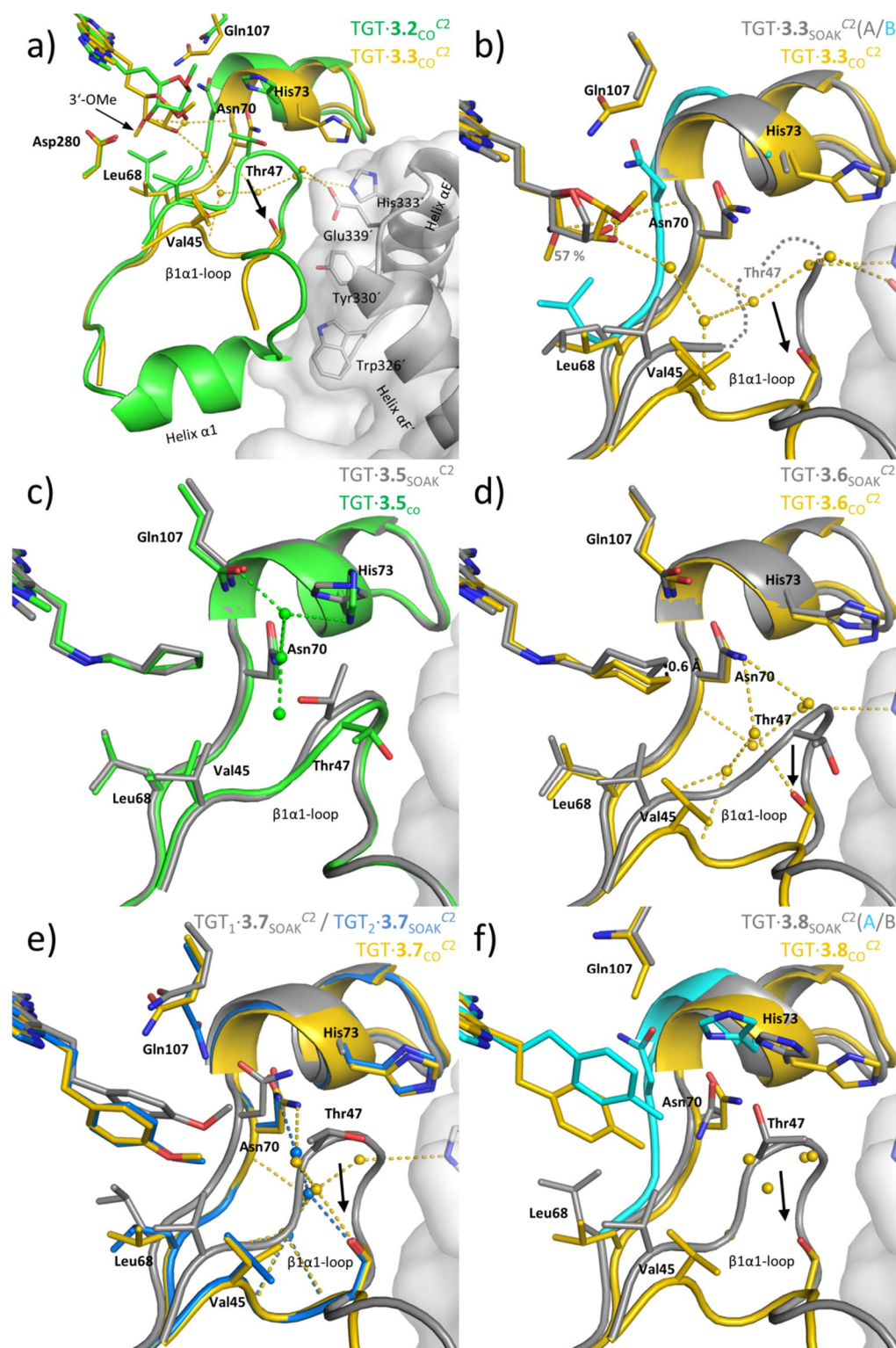


Figure 3.2. Binding modes and structural arrangements of **3.2**, **3.3** and **3.5** – **3.8**. Color coding for carbons in parenthesis. Comparison of **a)** TGT-**3.2**_{CO}^{C2} (green) and TGT-**3.3**_{CO}^{C2} (yellow), **b)** TGT-**3.3**_{SOAK}^{C2} (conformation B cyan and conformation A gray) and TGT-**3.3**_{CO}^{C2} (yellow), **c)** TGT-**3.5**_{SOAK}^{C2} (gray) and TGT-**3.5**_{CO}^{C2} (green), **d)** TGT-**3.6**_{SOAK}^{C2} (gray) and TGT-**3.6**_{CO}^{C2} (yellow), **e)** TGT-**3.7**_{SOAK}^{P2} (TGT₁ gray; TGT₂ blue) and TGT-**3.7**_{CO}^{C2} (yellow), **f)** TGT-**3.8**_{SOAK}^{C2} (conformation A: cyan and conformation B gray) and TGT-**3.8**_{CO}^{C2} (yellow). Selected water molecules are shown as spheres and colored as the corresponding complex. For the sake of clarity residues of the guanine-34/preQ₁ binding site that interact with the *lin*-benzoguanine scaffold are not shown. Solvent accessible surface and selected residues as sticks of the second monomer of the homodimer are colored gray. Position of missing Thr47 in TGT-**3.3**_{SOAK}^{C2} is indicated as gray dashed lines. Black arrows indicate positional differences between the crystal structures of different crystallization protocols. Occupancies for the different side chains are displayed using the corresponding color of the ligand. Inhibitors **3.3**, **3.6**, **3.7** and **3.8** displace the β1α1-loop in the co-crystal structures. Colored dashed lines indicate H-bonds from selected water molecules (2.4 - 3.5 Å).

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

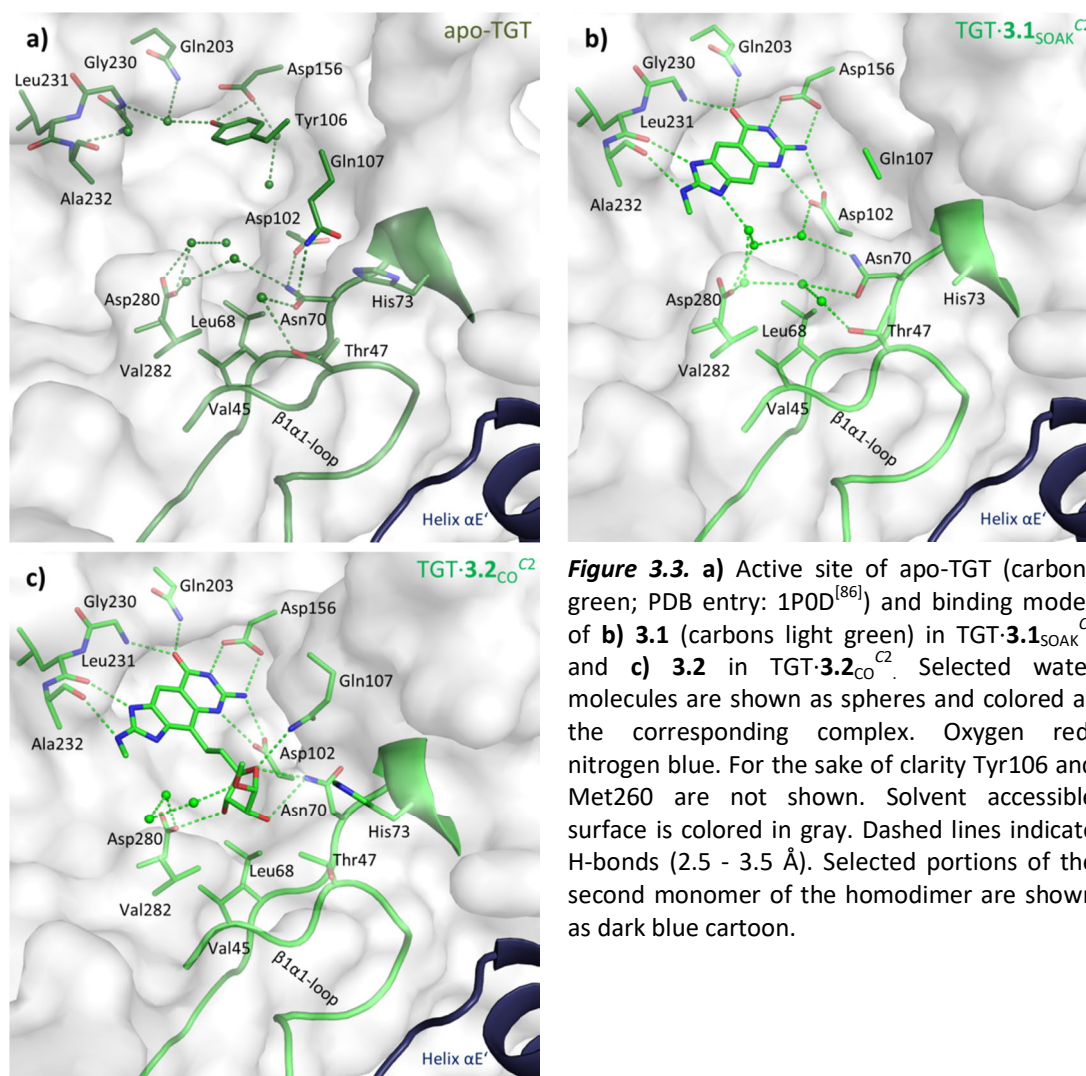


Figure 3.3. a) Active site of apo-TGT (carbons green; PDB entry: 1POD^[86]) and binding modes of b) **3.1** (carbons light green) in TGT·**3.1**_{SOAK}^{C2} and c) **3.2** in TGT·**3.2**_{CO}^{C2}. Selected water molecules are shown as spheres and colored as the corresponding complex. Oxygen red, nitrogen blue. For the sake of clarity Tyr106 and Met260 are not shown. Solvent accessible surface is colored in gray. Dashed lines indicate H-bonds (2.5 - 3.5 Å). Selected portions of the second monomer of the homodimer are shown as dark blue cartoon.

Since in ligand **3.3** the furanosyl 3'-OH group is methylated, its H-bond donor functionality is lost and no contact to Asp280 is formed in TGT·**3.3**_{CO}^{C2} (**Figures 3.2a** & **3.4b**). In contrast, as observed in TGT·**3.2**_{CO}^{C2}, an H-bond is formed between the endocyclic furanoside oxygen of **3.3** and the carboxamide of Gln107. Compared to TGT·**3.2**_{CO}^{C2}, however, Gln107 adopts its usual position as observed in nearly all TGT structures. The additional methyl group of **3.3** induces a strikingly different conformation of the 4-substituent compared with that of **3.2** in TGT·**3.2**_{CO}^{C2}, in which its furanosyl moiety pushes Asn70 toward His73. Remarkably, compared to the crystal structure of apo-TGT, a similar movement of Asn70 (entailing a visible shift of two residues preceding and two residues succeeding Asn70) is present in all considered following crystal structures unless stated otherwise. As against the apo-structure, in TGT·**3.3**_{CO}^{C2} the side chain of His73 experiences a vast rotation toward the dimer interface.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Furthermore, the furanosyl moiety in TGT·**3.3**_{CO}^{C2} bears against the *hydrophobic floor* of the R34/P35-pocket thereby forcing Leu68 to move toward Val45, which, consequently, is also displaced. Importantly, the shift of Val45 entails the dislocation of Gly46 and Thr47 by as much as 6.6 Å (Thr47 Cα).

The tremendous movement of Thr47 has strong influence on the geometry of the *loop-helix motif* usually shielding a cluster of aromatic residues within the TGT homodimer interface from water access. While the three N-terminal residues of the loop β1α1 (Thr47 to Ala49) now follow a completely altered course, the remaining part of this loop (residues 50 to 55) as well as the helix α1 (residues 56 to 61) are no longer crystallographically resolved in TGT·**3.3**_{CO}^{C2}. Within the dimer interface, the *loop-helix motif* contributes a considerable number of interactions between both subunits (six H-bonds, six salt bridges and 70 van-der-Waals contacts; based on PDB entry 1POD^[86]). Thus, its collapse, as induced by **3.3**, will supposedly cause a severe destabilization of TGT dimer interface contacts. Notably, the breakdown of the *loop-helix motif* is concomitant with significant changes of unit cell parameters. While the a-axis is reduced by about 6 Å, the β-angle shrinks by more than 2° compared to common *Z. mobilis* TGT crystals.

3.4.3 The Influence of Ligand 3.3 on Dimer Architecture is not Revealed by Soaking 3.3 into apo-TGT Crystals.

In a former study, we had shown that the structure of TGT co-crystallized with **3.4** (TGT·**3.4**_{CO}^{C2}) reveals a binding mode which is significantly different from that seen in the structure obtained after soaking **3.4** into an apo-TGT crystal (TGT·**3.4**_{SOAK}^{C2}) (**Table 3.1**; Figure S2)^[27]. Similar to TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, the adopted binding mode in TGT·**3.4**_{CO}^{C2} leads to a pronounced rearrangement of the *loop-helix motif* accompanied by conspicuous changes of unit cell parameters (reduction of the a-axis and shrinking of the β-angle). In contrast, neither any change in the geometry of the *loop-helix motif* nor in unit cell parameters is seen in TGT·**3.4**_{SOAK}^{C2}.

This prompted us to investigate whether the binding mode of **3.3** also depends on the applied co-crystallization or soaking protocol. Therefore, we determined a structure obtained from a crystal of apo-TGT soaked with this ligand (TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}).

As expected, the unit cell parameters in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2} are virtually identical to those normally present in *Z. mobilis* TGT crystals. Yet, compared to TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, significant differences in the binding mode of the ligand's 4-substituent are observed (**Figure 3.2b**). While clear electron density is visible for the entire inhibitor in TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, its furanosyl moiety is poorly defined in the electron density of TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}. In fact, the occupancy of the furanosyl ring in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2} was refined to 57% only and, as it proved impossible to reliably spot the 2-methoxy and the 3-methyl group of this moiety, they are missing in the final model. In addition, while two water molecules interact with the furanosyl moiety in TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, no electron density for any water molecule is present at equivalent positions in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}. This suggests that the 4-substituent in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2} is considerably more flexible or scattered over multiple arrangements compared to TGT·**3.3**_{CO}^{C2}. Furthermore, in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2} the center of the furanosyl ring is shifted by about 1.3 Å toward the solvent (**Figures 3.2b & 3.4a/b**). Aside from missing electron density for the Gln107 side chain in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}, all residues lining the guanine-34/preQ₁ binding site including the catalytic residues Asp102 and Asp280 superimpose perfectly well in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2} and TGT·**3.3**_{CO}^{C2}. Likewise, in both structures a water molecule bridges N3 of the *lin*-benzoguanine scaffold and the endocyclic oxygen of the furanosyl ring (**Figures 3.4a,b**). Significant differences, however, are observed in the vicinity of the bound furanosyl ring. While the stretch of residues comprising Leu68 to His73 follows a clearly defined course in TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, the same stretch adopts two alternative conformations (A and B) in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}. Conformation B is virtually identical to that seen in the structure with the 4-unsubstituted ligand **3.1** (**Figures 3.3b & 3.3a**). Yet, as the side chains of Leu68 and Asn70 form unacceptably close contacts to the ligand's furanosyl, this conformation is not compatible with the present furanosyl placement.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Consequently, it was refined to an occupancy of 43%, which is complementary to the occupancy of the furanosyl moiety. In contrast, conformation A allows binding of the ligand's furanosyl portion as displayed in the crystal structure and was refined to an occupancy of 57%. The course of Leu68 to His73 in conformation A is highly similar to that in TGT·**3.3**_{CO}^{C2} except for no electron density being present for the side chain of His73 and a different conformation adopted by the side chain of Leu68 (**Figure 3.2b**). The latter differs from that observed in apo-TGT and constitutes the only change in the *hydrophobic floor* induced by the ligand in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}. Importantly, in contrast to TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, the position of Val45 remains unchanged. Consequently, the concomitant vast movement of Thr47, which leads to the collapse of the *loop-helix* motif in TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, is not observed in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}. Although no proper electron density is observed for Thr47, it likely remains close to its original position, leaving the *loop-helix motif* and, thus, the dimer interface unaffected.

In summary, the binding of ligand **3.3** to TGT in solution most likely induces pronounced conformational adaptations of TGT allowing energetically favorable interactions between the ligand's furanosyl and the protein as observed in TGT·**3.3**_{CO}^{C2}. Once, however, protein flexibility is constrained by the crystal packing of a pre-formed apo-crystal the mutual induced-fit adaptations of protein and ligand appear strongly reduced in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2} and favorable interactions between the ligand's furanosyl and the R34/P35-pocket are hampered. Supposedly, to a certain extent the protein largely retains its original conformation and the ligand's furanosyl adopts no well-defined conformation, thus remaining invisible in the crystal structure. No electron density is detectable in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2} for this moiety which would be compatible with conformation B of the Leu68-to-His73 stretch. To some extent, however, partial adaptation of the Leu68-to-His73 stretch to the ligand may occur (course A of this stretch in TGT·**3.3**_{CO}^{C2}) facilitating interactions between the protein and the ligand's furanosyl. Yet, the conformational changes within the protein, observed in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}, remain locally confined. As a consequence, this structure does not allow assessing the situation in solution, not to mention the ligand's impact on dimer stability. In the course of the present study we made similar observations for a number of further ligands which are described in the following.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

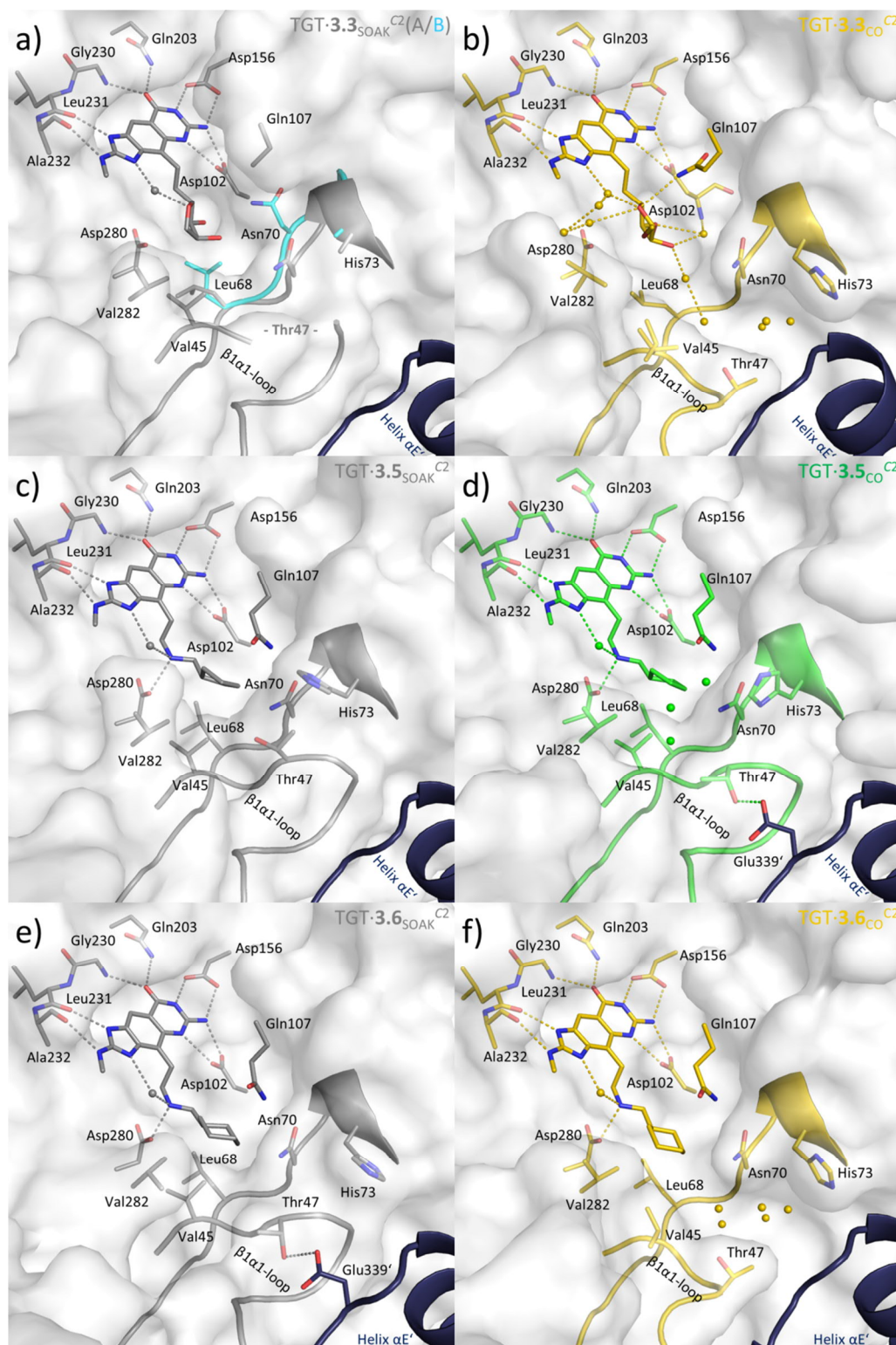


Figure 3.4. Active site of **a)** TGT-3.3_{SOAK}^{C2} (carbons gray and cyan, indicating split conformations observed in the protein), **b)** TGT-3.3_{CO}^{C2} (carbons yellow), **c)** TGT-3.5_{SOAK}^{C2} (carbons gray), **d)** TGT-3.5_{CO}^{C2} (carbons light green), **e)** TGT-3.6_{SOAK}^{C2} (carbons gray), **f)** TGT-3.6_{CO}^{C2} (carbons yellow). Selected water molecules are shown as spheres and colored as the corresponding complex. Oxygen red, nitrogen blue. For the sake of clarity Tyr106 and Met260 are not shown. Solvent accessible surface is displayed in gray. Dashed lines indicate H-bonds (2.6 - 3.5 Å). Selected portions of the second monomer of the homodimer are shown as dark blue cartoon.

3.4.4 Ligands 3.5 and 3.6 Differing in Aliphatic Ring Size, Exert Distinct Influence on TGT Dimer Architecture.

A structure of **3.5** in complex with TGT, obtained by soaking the single-digit nanomolar inhibitor into preformed TGT crystals (TGT·**3.5**_{SOAK}^{C2}), was published previously by us^[13]. The 4-(cyclopentyl-methylamino)ethyl substituent is well-defined in the electron density and deeply penetrates into the R34/P35-pocket (**Figures 3.2c & 3.4c**). This placement allows for energetically favorable interactions between the *hydrophobic floor* and the ligand's cyclopentyl moiety, which adopts a twist envelope conformation. Compared to apo-TGT, the cyclopentyl moiety causes a slight rotation of the Leu68 side chain (compare **Figures 3.2c & 3.3a**). However, this rotation has no influence on the position of Val45 or any further nearby residue. Close to the guanine-34/preQ₁ binding site, a water molecule mediates an interaction between N3 of the *lin*-benzoguanine scaffold and the 4-substituent's secondary amino group. The latter is likely protonated enabling the formation of a salt bridge with the carboxylate group of Asp280.

The newly determined co-crystal structure TGT·**3.5**_{CO}^{C2} displays a binding mode closely resembling that in TGT·**3.5**_{SOAK}^{C2}. Only slight differences are found for a small number of residues lining the R34/P35-pocket. Compared to TGT·**3.5**_{SOAK}^{C2}, the side chain of Thr47 is rotated, thus allowing the formation of a strong H-bond (2.7 Å) to the side chain of Glu339' of the dimer mate (**Figure 3.4d**). This rotation is concomitant with an approximate 90° rotation of the His73 imidazole, enlarging the R34/P35-pocket. This enables the accommodation of three well-defined water molecules not found in TGT·**3.5**_{SOAK}^{C2}. Yet, the binding of **3.5** does not have major impact on the geometry of the protein and leaves the *loop-helix motif* within the dimer interface virtually unaffected (**Figures 3.2c & 3.4c,d**). Interestingly, in TGT·**3.5**_{CO}^{C2} a chloride ion, confirmed by its anomalous scattering contribution (**Chapter 11**), is coordinated by the carboxamide of Gln107 and the backbone amides of Thr71 and Tyr72 (**Figure 3.5**). Presumably, it is also present in TGT·**3.4**_{CO}^{C2}, but was erroneously refined as a water molecule leading to an exceedingly low *B*-factor of 4.7 Å².

Similar to **3.5**, ligand **3.6** constitutes a potent inhibitor of bacterial TGT with single digit nanomolar affinity. Both inhibitors only differ by the replacement of a terminal cyclopentyl (**3.5**) by a cyclohexyl ring (**3.6**) in the 4-substituent. Like TGT·**3.5**_{SOAK}^{C2}, the crystal structure TGT·**3.6**_{SOAK}^{C2} was published by us previously^[13]. Similar to TGT·**3.5**_{SOAK}^{C2} and TGT·**3.5**_{CO}^{C2}, a water molecule bridges N3 of the *lin*-benzoguanine and the 4-substituent's secondary amino group in TGT·**3.6**_{SOAK}^{C2}, which forms a salt bridge to the carboxylate group of Asp280 (**Figures 3.2c,d & 3.4c-e**). The entire 4-substituent of **3.6** is well-defined in the electron density with its cyclohexyl moiety adopting a chair conformation. It deeply penetrates into the R34/P35-pocket making extensive van-der-Waals interactions with the *hydrophobic floor* of this pocket.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

The aliphatic ring of **3.6** slightly shifts the side chain of Leu68, yet, without affecting the position of Val45 or any further nearby residues. Compared to apo-TGT, the side chain of His73 experiences a vast rotation into the direction of the dimer interface (comparable to TGT·**3.3**_{CO}^{C2}). Similar to TGT·**3.5**_{CO}^{C2}, the Thr47 side chain adopts a conformation capable to form an H-bond to the Glu339' side chain of the dimer mate. As in TGT·**3.5**_{SOAK}^{C2} and TGT·**3.5**_{CO}^{C2}, this does not affect the backbone of Thr47 and no impact on the geometry of the *loop-helix motif* and the dimer interface architecture is experienced.

In contrast to TGT·**3.5** structures, TGT·**3.6**_{CO}^{C2} is strongly altered in comparison to TGT·**3.6**_{SOAK}^{C2}. In TGT·**3.6**_{CO}^{C2}, the ligand's cyclohexyl moiety penetrates approximately 0.6 Å more deeply into the R34/P35-pocket (**Figures 3.2d & 3.4e,f**). Thereby it comes unfavorably close to Val45 (2.7 Å), which, as a consequence, is displaced from its original position by about 2 Å (C α). This entails a pronounced shift of adjacent Gly46 and Thr47 residues, whose original positions are then occupied by three and two water molecules, respectively. As a result, the first three residues of the *loop-helix motif*, Thr47 to Ala49, take an entirely different course and the following residues, Thr50 to Thr62, are, due to disorder, no longer crystallographically resolved. As in TGT·**3.3**_{CO}^{C2} and TGT·**3.4**_{CO}^{C2}, these extensive structural rearrangements are concomitant with a reduction of the unit cell a-axis and β -angle. Accordingly, while ligand **3.5** exerts no influence on dimer architecture, the closely related ligand **3.6**, whose aliphatic ring system is expanded by a single methylene group, is able to cause the breakdown of the *loop-helix motif*, which may entail a significant destabilization of the dimer interface.

As in TGT·**3.5**_{CO}^{C2}, a chloride ion bound to Gln107, Thr71, and Tyr72 was identified in TGT·**3.6**_{CO}^{C2} (**Figure 3.5**). Most probably, it is also present in TGT·**3.6**_{SOAK}^{C2} but there it was refined as a water molecule leading to the low *B*-factor of 8.2 Å².

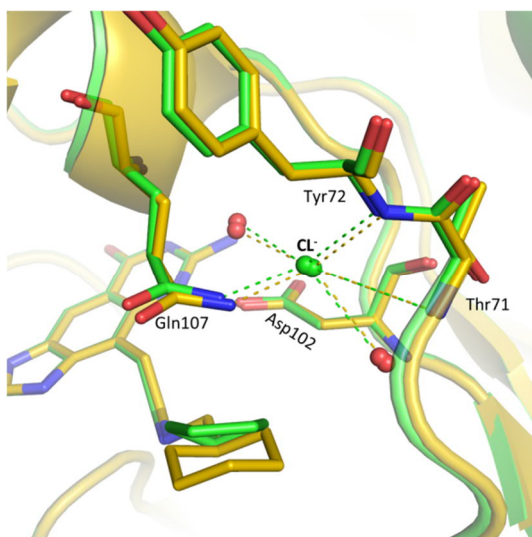


Figure 3.5. Position of a recurring chloride ion. Protein is displayed as cartoon. Chloride ions are presented as green spheres. Inhibitors and residues involved in the coordination of the chloride ion are presented as sticks. Selected water molecules are displayed as red spheres. The interactions of the chloride ions are between 3.1 and 3.8 Å to Gln107-NH, Thr71-NH, Tyr72-NH and to two water molecules. Coordination of the chloride ion in TGT·**3.5**_{CO}^{C2} (carbons green) is displayed as green dashed lines. The peak intensity of the anomalous signal is $\sigma = 5.4$. The chloride ion coordination in TGT·**3.6**_{CO}^{C2} (carbons yellow) is colored in yellow. The corresponding peak intensity of the anomalous signal is $\sigma = 4.5$. The chloride probably originates from the 2 M NaCl (high salt buffer) used for the storage of TGT.

3.4.5 Co-Crystallization of TGT with 3.7 Reverses the Space Group Change Observed in Soaked Crystal Structure.

TGT·3.7_{SOAK}^{P2} was determined by us in 2007^[137]. It reveals a unique reduction of crystal symmetry from space group C2 with one TGT monomer per asymmetric unit (resulting in two identical dimers per unit cell) to space group P2. In P2 the asymmetric unit consists of two conformationally non-identical monomers, referred to as TGT₁·3.7_{SOAK}^{P2} (chain A) and TGT₂·3.7_{SOAK}^{P2} (chain D).

TGT₁·3.7_{SOAK}^{P2} exhibits typical features commonly found in structures of TGT in complex with a 4-substituted *lin*-benzoguanine obtained by soaking. In this structure, the 2-(4-methoxyphenyl)ethyl substituent seems rather flexible as indicated by moderately defined electron density^[137]. Compared to the apo-TGT structure, only minor ligand-induced conformational changes in the R34/P35-pocket are observed. Insufficient electron density is observed for the side chain of His73 indicating disorder. In addition, the side chains of Leu68 and Thr47 are rotated to avoid clashes with the terminal methoxy group of the 4-substituent (compare **Figures 3.3a & 3.6a**). Yet, overall no significant influences on the geometry of adjacent structural elements within the protein are detected (**Figure 3.2e**).

In contrast, the situation in TGT₂·3.7_{SOAK}^{P2} is strongly reminiscent of what is observed in many co-crystal structures of TGT with 4-substituted *lin*-benzoguanines. Here, the entire ligand is excellently defined in the electron density concomitant with average *B*-factors of the ligand (30.7 Å²), particularly of the 4-substituent (32.9 Å²), which are clearly lower than in TGT₁·3.7_{SOAK}^{P2} (45.0 Å² / 53.4 Å²)^[137]. The *p*-methoxyphenyl moiety immerses, compared to TGT₁·3.7_{SOAK}^{P2}, significantly deeper into the R34/P35-pocket. At the *hydrophobic floor* of this pocket, it comes unacceptably close to Leu68 (1.0 Å), which is shifted toward Val45 (**Figures 3.2e & 3.6b**). Consequently, Val45 is displaced and the neighboring residues, Gly46 and Thr47, are considerably dislocated. Also here a collapse of the *loop-helix motif* from Ala48 to Thr62 is caused, and thus, these residues remain crystallographically invisible in TGT₂·3.7_{SOAK}^{P2}.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

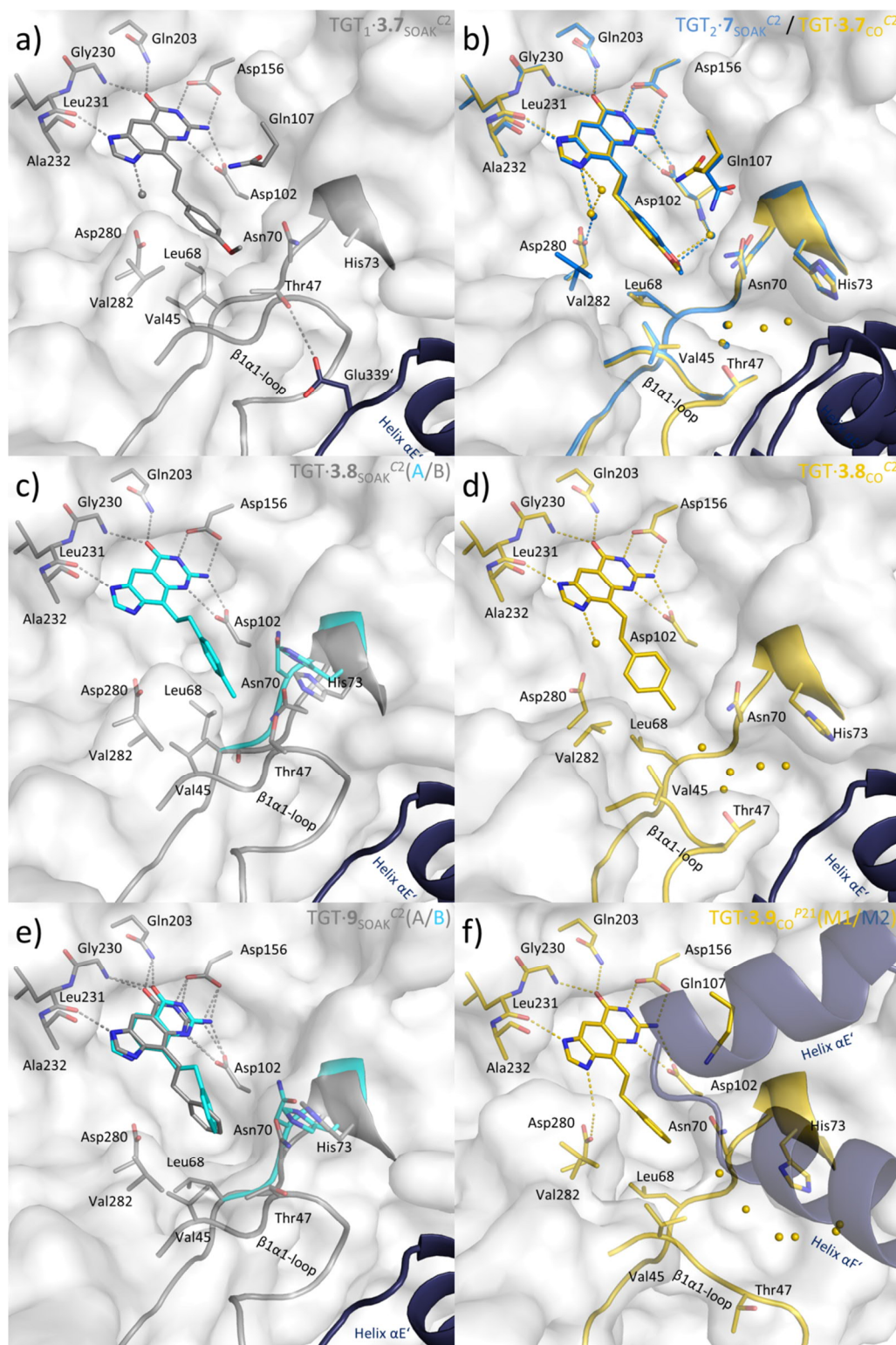


Figure 3.6. Active site of **a)** TGT₁-3.7^{P2}_{SOAK} (carbons gray), **b)** TGT₂-3.7^{P2}_{SOAK} (carbons blue) & TGT-3.7^{C2}_{CO} (carbons yellow), **c)** TGT-3.8^{C2}_{SOAK} (carbons gray and cyan, indicating the split conformations observed in the protein), **d)** TGT-3.8^{C2}_{CO} (carbons yellow), **e)** TGT-3.9^{C2}_{SOAK} (carbons gray and cyan, indicating the split conformations observed for the protein and ligand), **f)** TGT-3.9^{P21}_{CO} (carbons yellow). Selected water molecules are shown as spheres and colored as the corresponding complex. Oxygen red, nitrogen blue. For the sake of clarity Tyr106 and Met260 are not shown. Solvent accessible surface is displayed in gray. Dashed lines indicate H-bonds (2.6 - 3.7 Å). Selected portions of the second monomer of the homodimer are shown as dark blue cartoon.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Co-crystallization of TGT with **3.7** was done in this study leading to TGT·**3.7**_{CO}^{C2}, in which the original C2 space group was re-established although, similar to TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, TGT·**3.4**_{CO}^{C2} and TGT·**3.6**_{CO}^{C2}, the α -axis and the β -angle are clearly reduced (**Table 3.1**). In TGT·**3.7**_{CO}^{C2}, the ligand adopts a virtually identical conformation to TGT₂·**3.7**_{SOAK}^{P2} (**Figures 3.2e & 3.6b**). Within the *hydrophobic floor*, the terminal methoxy group of the ligand pushes Leu68 toward Val45, which is dislocated from its original position. Val282 as well as the neighboring Cys281 become disordered, as indicated by ill-defined electron density. The shift of Val45 involves a pronounced movement of Gly46 and Thr47, which causes the collapse of the *loop-helix motif*. While Ala53 to Thr62 are not visible in the electron density, the remaining part of this motif follows a completely different course compared to what is usually observed.

3.4.6 Shrinking OMe to Me at the 4-Substituent still Disturbs TGT Dimer Interface Architecture.

The 4-substituent of **3.8**, a 2-(*p*-toluyl)ethyl moiety, is highly similar to that of **3.7** and the corresponding TGT·**3.8**_{SOAK}^{C2} was reported by us previously^[137]. Here, reminiscent of the situation in TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}, the Gly69 to His73 segment adopts two different conformations (A and B), which refine to an occupancy of 49% and 51%, respectively (**Figures 3.2f & 3.6c**). Conformation A is nearly indistinguishable from that in TGT·**3.1**_{SOAK}^{C2}. In contrast, conformation B leads to an expansion of the R34/P35-pocket with Asn70 shifted off its original position. Here, the course of the Gly69-to-His73 stretch corresponds to that found for most of the TGT complexes discussed in this paper (except TGT·**3.2**_{CO}^{C2}). By analogy with TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}, the 4-substituent of **3.8** is partially ill-defined in the electron density as reflected by conspicuously high *B*-factors assigned to its atoms^[137]. However, in contrast to TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}, the 4-substituent in TGT·**3.8**_{SOAK}^{C2} is definitely compatible with course A of the Gly69-to-His73 segment (resembling the conformation of this segment in TGT·**3.1**_{SOAK}^{C2}). Yet, although the occupancy of the 2-(*p*-toluyl)ethyl moiety was set to 100%, the electron density map of TGT·**3.8**_{SOAK}^{C2} shows further, rudimentary density indicating an alternative conformation of this moiety. Obviously there, the 4-substituent immerses considerably more deeply into the R34/P35-pocket thereby forcing the Gly69-to-His73 segment into conformation B. Compared to apo-TGT, the side chain of Val282 is rotated by about 70° in TGT·**3.8**_{SOAK}^{C2} (compare **Figures 3.3a & 3.6c**). However, no conformational changes are observed for Leu68 and Val45 within the *hydrophobic floor* and C α of Thr47 retains its original position. Thus, the *loop-helix motif* remains intact in TGT·**3.8**_{SOAK}^{C2}.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

In TGT·3.8_{CO}^{C2} determined in this study, the 2-(*p*-toluyl)ethyl moiety is present in a single conformation (**Figures 3.2f, 3.6d**), which corresponds to the above-mentioned rudimentary electron density observed in TGT·3.8_{SOAK}^{C2}. Additionally, the course of the Gly69-to-His73 segment in TGT·3.8_{CO}^{C2} is highly similar to conformation B of this stretch in TGT·3.8_{SOAK}^{C2}. The toluyl moiety of the ligand deeply immerses into the R34/P35-pocket thereby coming unfavorably close to Leu68 within the *hydrophobic floor* (2.6 Å). Consequently, Leu68 is shifted toward Val45 and displaces the latter from its original position. As repeatedly observed, the shift of Val45 provokes a pronounced movement of Gly46 and Thr47, which ultimately rearranges the *loop-helix motif*. Despite the fact that the crystallographically undefined section of this motif in TGT·3.8_{CO}^{C2} is relatively short (Lys55 to Arg60), it takes a completely different course in comparison to what is normally seen in crystal structures of *Z. mobilis* TGT. Four well-defined water molecules are identified in close vicinity of Thr47 indicating that its original task, to shield the dimer interface from water access, is no longer performed by the former *loop-helix motif* in the geometry found in TGT·3.8_{CO}^{C2} (**Figures 3.2f & 3.7**). Here again, the restructuring and partial collapse of the *loop-helix motif* is accompanied by a reduction of the α -axis and β -angle (**Table 3.1**).

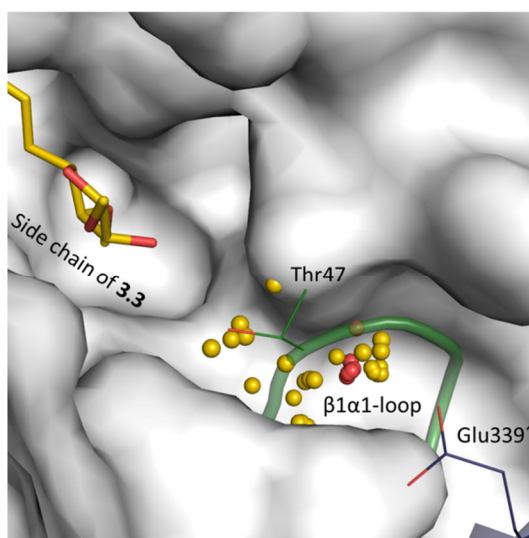


Figure 3.7. Incorporated water molecules around Thr47 of all investigated TGT-inhibitor complexes. Solvent accessible surface of TGT·3.3_{CO}^{C2} is displayed in gray; inhibitor 3.3 is colored yellow and presented as sticks. Selected residues of apo-TGT structure (PDB entry: 1POD^[86]) are shown as lines or cartoon and are colored green. Residue Glu339' from second monomer of the homodimer is colored dark blue. Water molecules around Thr47 of the β 1 α 1-loop (as taken from apo-protein structure) are shown as spheres. Color coding for water molecules: Yellow: complexes where the β 1 α 1-loop was disturbed by ligand binding (TGT·3.3, 3.4, 3.6–3.9_{CO}^{C2/P2} & TGT₂·3.7_{SOAK}^{P2}). Red: complexes where the β 1 α 1-loop was not disturbed by ligand binding (TGT·3.1_{SOAK}^{C2}, TGT·3.2_{CO}^{C2} and TGT·3.5_{CO/SOAK}^{C2}).

3.4.7 Removal of the Terminal Methyl Group in 3.9 Triggers a Profound Rearrangement of the Homodimer.

Ligand **3.9** solely differs from **3.8** by the removal of the terminal toluyl methyl group. In TGT-**3.9**_{SOAK}^{C2}, previously determined by us^[137], the 4-substituent adopts two conformations (A and B) which can be interconverted by rotating about the covalent bond attaching the 4-substituent to the *lin*-benzoguanine scaffold (**Figures 3.6e & 3.8**). In conformation B (occupancy of 44%), the substituent remains more solvent exposed, while it deeply immerses into the R34/P35-pocket in conformation A (occupancy of 56%). Reminiscent of TGT-**3.3**_{SOAK}^{C2} and TGT-**3.8**_{SOAK}^{C2}, the two conformations of the ligand's 4-substituent are accompanied by two conformations (A and B) of the TGT segment comprising Leu68 to His73. Also in TGT-**3.9**_{SOAK}^{C2}, conformation B of this stretch is highly similar to that observed in TGT-**3.1**_{SOAK}^{C2}. Conformation A leads to an enlargement of the R34/P35-pocket with Cα of Asn70 being shifted by 2.3 Å. In contrast to the apo-structure of TGT, no electron density is observed for the side chain of Gln107 as it is obviously disordered. Furthermore, the side chain of Thr47 adopts a conformation which allows forming a weak H-bond to the side chain amino group of Lys52. Within the *hydrophobic floor* the side chain of Leu68 is rotated by about 90°, which, however, has no influence on Val45. Accordingly, the positions of Thr47, the *loop-helix motif*, and the architecture of the dimer interface remain unaltered in TGT-**3.9**_{SOAK}^{C2}.

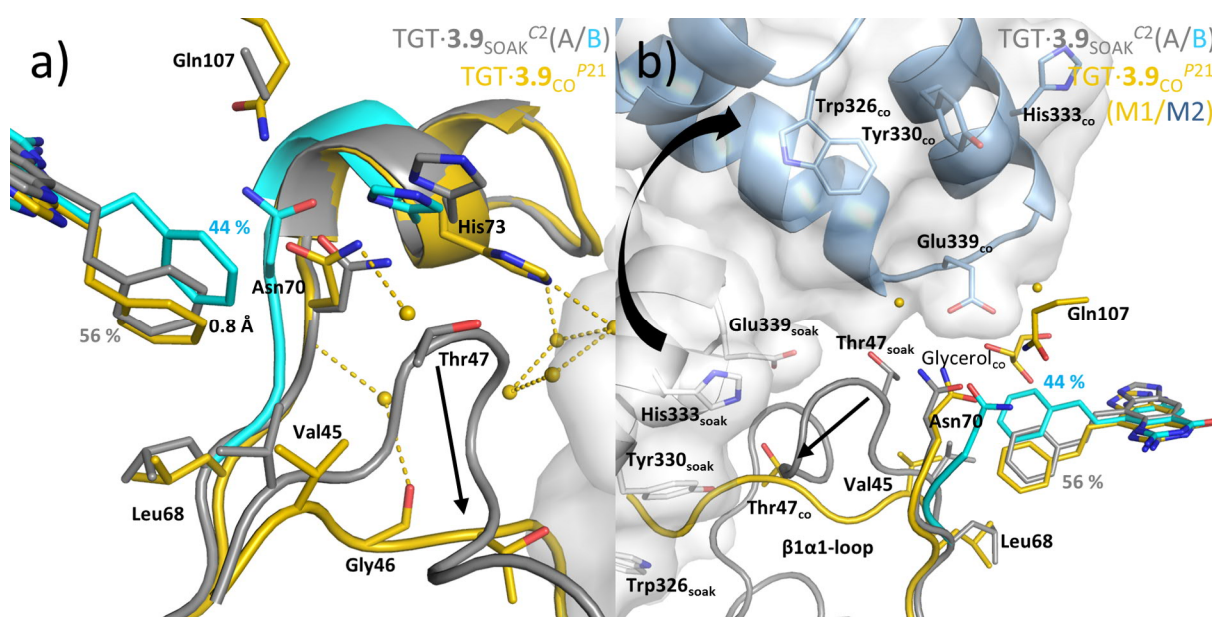


Figure 3.8. Binding modes and structural rearrangements of **3.9**. **a)** in TGT-**3.9**_{SOAK}^{C2} (conformation A gray and conformation B cyan) and TGT-**3.9**_{CO}^{P21} (yellow), **b)** View from an alternative direction including the second monomer of TGT-**3.9**_{CO}^{P21} in light blue and with gray solvent accessible surface. Black arrows indicate positional differences between the crystal structures of different crystallization protocols. Inhibitor **3.9** displaces the β1α1-loop in the co-crystal structure and triggers a new *twisted dimer* formation (see **Figure 3.10**). Yellow dashed lines indicate H-bonds from selected water molecules (2.7 - 3.4 Å).

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

In this study, we determined TGT·**3.9**_{CO}^{P21} revealing an unexpectedly profound influence of ligand **3.9** on the TGT dimer architecture. The ligand's 4-substituent adopts only one conformation, resembling conformation A in TGT·**3.9**_{SOAK}^{C2}, although its phenyl moiety penetrates about 0.8 Å more deeply into the R34/P35-pocket (**Figures 3.8 & 3.6f**). In line with a single conformation of the 2-phenylethyl moiety, the Leu68-to-His73 stretch is also observed in only one conformation, which largely corresponds to conformation A of this segment in TGT·**3.9**_{SOAK}^{C2}. By immersing more deeply into the R34/P35-pocket, the phenyl ring of **3.9** bears against the *hydrophobic floor* and moves Leu68 away from its original position toward Val45. As a result, Val45 is displaced inducing a pronounced shift of the successive residues, Gly46 and Thr47. Similar to TGT·**3.3**_{CO}^{C2}, TGT·**3.4**_{CO}^{C2}, TGT·**3.6**_{CO}^{C2}, TGT₂·**3.7**_{SOAK}^{C2}, TGT·**3.7**_{CO}^{C2} and TGT·**3.8**_{CO}^{C2}, this leads to a reorganization of the *loop-helix motif*. Thereby, residues 51 to 58 of this motif become disordered as no electron density is observed for these amino acids. In stark contrast to all other mentioned crystal structures, the four N-terminal residues of loop β1α1, Thr47 to Thr50, take a course which directly leads into an area within the dimer interface normally harboring a cluster of four aromatic residues. This cluster, consisting of Phe92 as well as of Trp326', Tyr330', and His333' of the dimer mate (**Figures 3.8b & 3.9a**), could be characterized by us as a hot spot, strongly contributing to the stability of the TGT dimer interface^[25, 26].

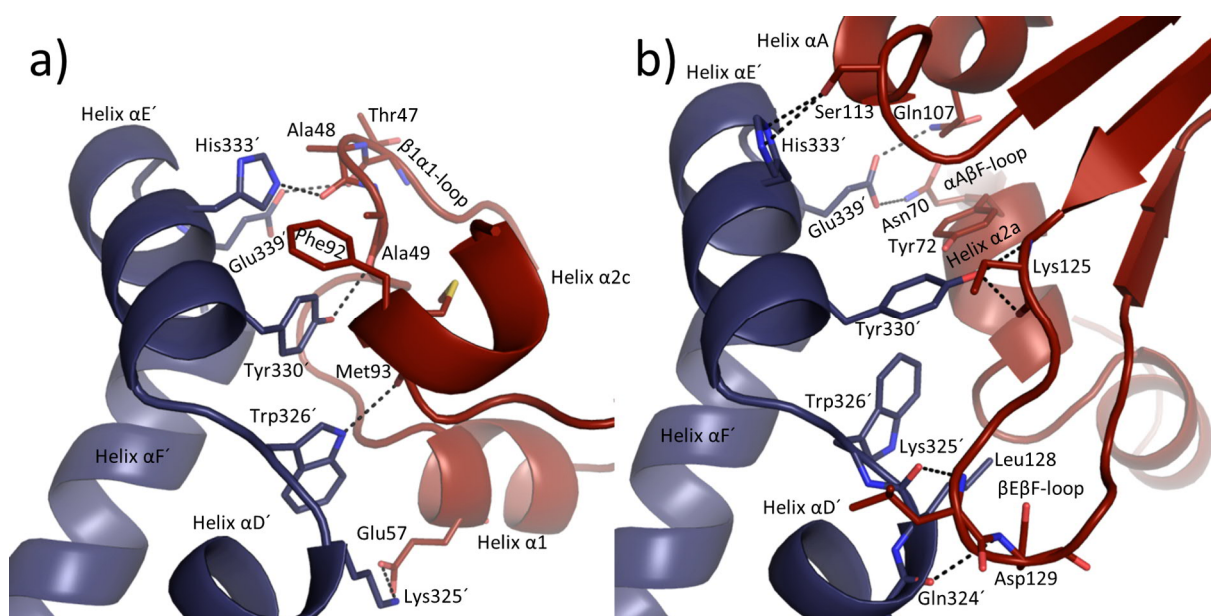


Figure 3.9. Illustration of the aromatic hot spot regions. H-bonds and salt bridges are displayed as black dashed lines. **a)** Arrangement of the aromatic hot spot region formed in apo-TGT structure (PDB entry: 1P0D^[86]). The β1α1-loop of the *loop-helix motif* shields this region against water access and can be perturbed by inhibitor binding (monomer 1 red, monomer 2 blue, space group C2). **b)** New arrangement of the hot spot region in the *twisted dimer* found in TGT·**3.9**_{CO}^{P21} (monomer 1 red, monomer 2 blue, space group P2₁).

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

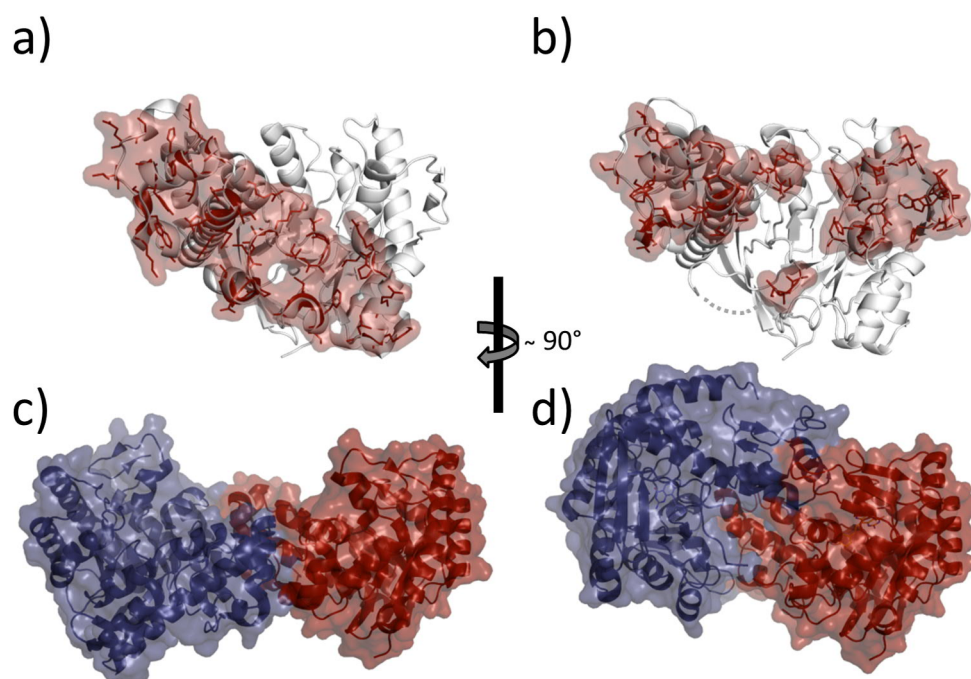


Figure 3.10. Comparison of alternative TGT dimer interfaces and oligomeric states. Dimer interface areas calculated using PDBePISA^[138] are highlighted by red surface patches and stick representation. **a)** apo-TGT dimer interface area of monomer 1: 1619 Å² (PDB entry: 1POD^[86]). **b)** *twisted dimer* interface of monomer 1: 1644 Å² (found in TGT·3.9_{CO}^{P21}) **c)** oligomeric state of apo-TGT dimer (monomer 1 red, monomer 2 blue) **d)** oligomeric state of *twisted dimer* (monomer 1 red, monomer 2 blue).

Due to the conformation adopted by the Thr47-to-Thr50 stretch in TGT·3.9_{CO}^{P21}, the conventional dimer architecture is not able to persist any more. Obviously, to avoid steric clashes between this stretch and residues Trp326', Tyr330', and His333', the two subunits assemble in a way strikingly different from what is usually observed in crystal structures of bacterial TGT (**Figure 3.10**). The conventional dimer interface of bacterial TGT consists of 43 residues per monomer, which form, in addition to 188 van-der-Waals interactions, 10 H-bonds and 14 salt bridges (**Figure 3.11a**; PDB entry 1POD^[86]). Thereby, the *loop-helix motif* (loop β1α1 plus helix α1) interacts with helices αE' and αD' of the dimer mate. In addition, interactions between helices α2a and αE', helix α2b and loop αC'αD', as well as helices α2c and αD' are observed. By contrast, the novel dimer interface as present in TGT·3.9_{CO}^{P21} consists of 46 residues forming 16 H-bonds and 6 salt bridges as well as 196 hydrophobic interactions. Thereby both, helices α2a and αA, interact with helix αF' while loop αAβD and βEβF forms interactions with helices αD' and αE' (**Figures 3.9b & 3.11b**). Loop β1α1 now interacts with loop β1α1' from the second monomer.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

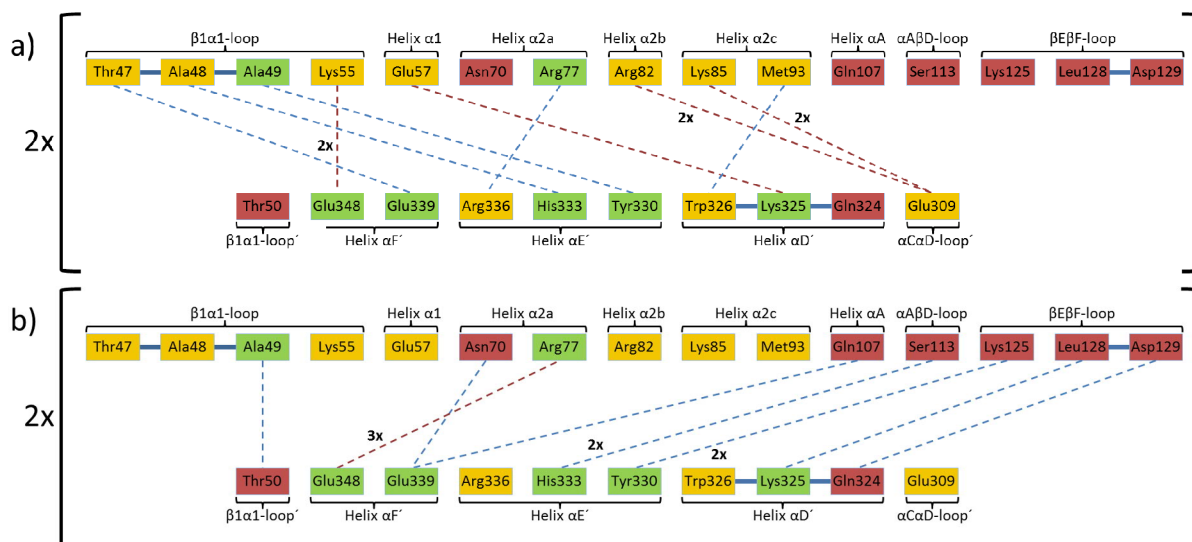


Figure 3.11. Polar interactions formed in **a)** apo-TGT structure (PDB entry: 1P0D^[86]) and **b)** *twisted dimer* found in TGT·3.9_{CO}^{P21}. Residues are indicated that form H-bonds or salt bridges across the interface only in apo-TGT structure (yellow), in both structures (green), and in the *twisted dimer* found in TGT·3.9_{CO}^{P21} (red), determined by CONTACTSYM^[139, 140]. Due to the interface symmetry, all displayed interactions occur twice but are only depicted once for reasons of clarity. Only H-bonds (blue dashed lines) and salt bridges (red dashed lines) with distances between 2.6 and 3.7 Å are depicted.

Notably, the contact surface of the novel dimer in TGT·3.9_{CO}^{P21}, henceforth referred to as *twisted dimer*, amounts to 1644 Å² per monomer (**Figure 3.10**), which does virtually not differ from that of the conventional TGT dimer (1619 Å² in the crystal structure of apo-TGT; **Figure 3.10a**). This suggests a considerable stability of this alternative dimer form, which, in the presence of **3.9**, may, in all likelihood, not be triggered by crystal contact formation but *a priori* exists in solution.

Not surprisingly, the radical reorganization of TGT dimer architecture as present in TGT·3.9_{CO}^{P21} is accompanied by substantial changes in unit cell parameters and symmetry. As mentioned, *Z. mobilis* TGT normally crystallizes in space group *C2* with one monomer per asymmetric unit, resulting in two identical dimers per unit cell. By contrast, the space group of TGT·3.9_{CO}^{P21} is *P2*₁, which still contains two homodimers per unit cell. Here, asymmetric units are related by a two-fold screw axis, thus each contains one homodimer made up of two conformationally non-identical monomers. Yet, the differences observed between both monomers of the asymmetric unit are very small and do not affect the binding mode of the ligand, which is virtually identical in both subunits (RMSD_{Cα} 0.12). We would like to emphasize, that in the presence of **3.9**, *Z. mobilis* TGT reproducibly and inevitably will crystallize in space group *P2*₁, even if seed crystals of space group *C2* are added to the crystallization droplet.

3.4.8 Native MS Study of in-Solution TGT:Ligand Mixtures Confirms Ligand-Induced Dimer Destabilization

In order to gain insights into the dimer disturbing potential of each ligand, native MS was performed. This technique enables to monitor the oligomerization state of TGT at equilibrium under non-denaturing conditions, in the absence or presence of saturating ligand concentrations^[15, 25-27].

Previously, we found that relative proportions of TGT monomer were strongly dependent on experimental (protein concentration, batch, conditioning) and instrumental settings (cone voltage, backing pressure). To ensure reliability, these comparative experiments were thus carried out adhering to strictly similar conditions (see Material & Methods and **Section 11.8.1**).

Relative proportions of TGT-monomer signals extracted from individual 1:10 TGT:ligand mixtures (TGT monomer 2.5 μ M) were quantified (Figure S7, **Table 3.2**) and normalized with respect to this value in the absence of any inhibitor. This revealed the dimer destabilization factor (**Figure 3.12**). Compared to measurements done in the absence of any ligand, a slightly increased proportion of TGT monomer was observed in the presence of **3.3**, **3.7**, **3.8**, and **3.9**. A small effect might be given for **3.4** although the effect is at the border of significance (see **Table 3.2** and Immekus *et al.* (2013)^[27]). In the corresponding co-crystal structures, all of these ligands were shown to interfere with the geometry of the *loop-helix motif* upon binding to TGT. No effect on dimer stability was observed by native MS for **3.1**, which lacks any 4-substituent, as well as for **3.2** and **3.5**, which, according to TGT·**3.2**_{co}^{C2} and TGT·**3.5**_{co}^{C2}, are not able to cause the collapse of the *loop-helix motif*.

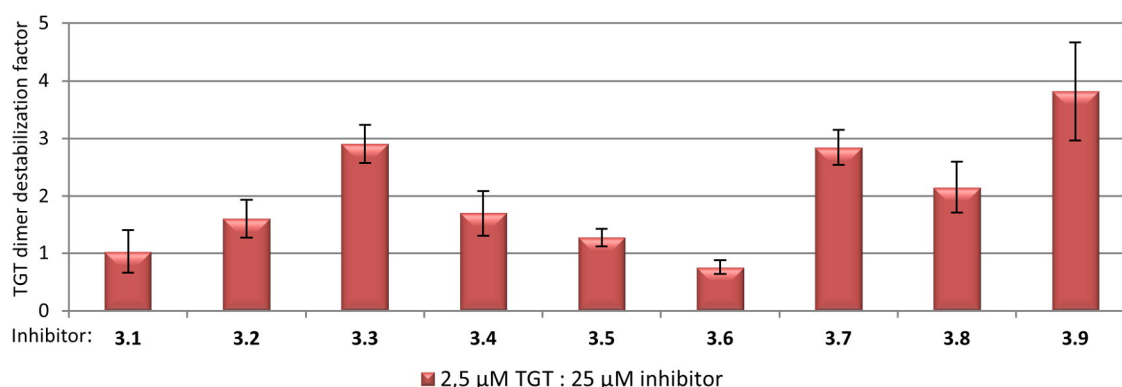


Figure 3.12. Native MS characterization of TGT dimer disturbing potential from each ligand. Relative quantification of TGT monomers and dimers signals was performed in absence (TGT 2.5 μ M) or presence of each ligand (TGT:ligand 1:10 mixture). TGT monomer ratios (%) deduced from each ligand mixture (Figure S7; **Table 3.2**) were normalized with respect to the apo-condition, enabling to rank inhibitors according to their destabilization factor. Corresponding means and standard deviations (black error bars) are derived from triplicate measurements.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Also ligand **3.6** did not exert any influence on dimer stability, which is contradictory with the co-crystallized structure, showing that binding of this ligand to TGT impedes the maintenance of the *loop-helix motif*.

However, this unexpected finding can be explained by a solubility issue, since ligand dilution in the buffer (1 M NH₄Ac pH 7.5) led to apparent precipitation of **3.6**. To a lower extent, a similar phenomenon was also observed for **3.4**. As the studied ligands differ in affinity their rates of dissociation from the complexes in the gas phase can slightly deviate with measurement conditions. This effect can take an impact on the comparability of the determined monomer/dimer ratios in the gas phase.

Table 3.2. Relative proportions of TGT monomers deduced from native MS study of TGT:ligand 1:10 mixtures

Relative proportion of TGT monomers (%) at 2.5 μ M TGT and 25 μ M Inhibitor (1:10):									
Inhibitor	3.1	3.2	3.3	3.4	3.5	3.6	3.7	3.8	3.9
1:10 ratio	3.4	5.3	9.6	5.6	4.2	2.5	9.4	7.1	12.6
	± 1.2	± 1.1	± 1.1	± 1.3	± 0.5	± 0.4	± 1.0	± 1.5	± 2.8

Measurements were performed in 1 M NH₄Ac pH7.5, $V_c = 80$ V, $P_i = 6$ mbar. For inhibitors **3.4** and **3.6**, partial precipitation upon ligand dilution in NH₄Ac buffer was detected. Analysis of 2.5 μ M TGT in absence of any ligand resulted in 3.3 ± 0.7 % TGT monomer. Corresponding errors are here expressed from triplicate measurements.

3.4.9 Inhibition Constants and Thermodynamic Profiles

The inhibition constants (K_i) of ligands **3.1** to **3.9**, which are listed in **Table 3.1**, were determined previously (except that of **3.4**, which was determined in this study)^[1, 12, 14, 137] *via* a well-established assay monitoring the TGT-catalyzed incorporation of radio-labeled guanine into tRNA. The relatively weak inhibition of TGT by **3.7** to **3.9**, exhibiting K_i values in the single-digit micromolar range, is caused by the fact that, unlike **3.1** to **3.6**, these inhibitors lack the methylamino group attached to position 2 of the *lin*-benzoguanine scaffold. This substituent addresses the ribose-33/uracil-33 pocket by forming an H-bond to the main chain carbonyl of Ala232 (**Figures 3.1, 3.4 & 3.6**). Compared to the unsubstituted *lin*-benzoguanine ($K_i = 4.1 \pm 1.0 \mu\text{M}^{[12]}$) the presence of this 2-substituent increases the affinity of ligand **3.1** (**Table 3.1**) by a factor of 70^[12].

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

To further analyze the binding properties of ligands studied in this contribution we decided to establish the thermodynamic analysis of a representative subset *via* isothermal titration calorimetry (ITC) (data for **3.1** had been determined previously^[118]). ITC enables the simultaneous determination of affinity (K_d) and stoichiometry (n) as well as enthalpic contribution (ΔH^0). The entropic ($-T\Delta S^0$) term to Gibbs free energy ($\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$) results from $\Delta G^0 - \Delta H^0$ difference^[141, 142]. Due to insufficient availability of some compounds in high purity, quantity and sufficient solubility to perform proper ITC measurements, we decided to focus our investigation on **3.1**, **3.2**, **3.3** and **3.5**.

We recently discovered that the binding of *lin*-benzoguanine derivatives is associated with protonation effects that are superimposed to the heat signal of ligand binding to TGT. Systematic analysis of the protonation inventory of the tricyclic scaffold revealed that the source of these overlying effects is the protonation of *N5* of the *lin*-benzoguanine scaffold^[118]. Such protonation effects become transparent when ITC measurements are performed from at least three different buffers (see **Section 11.6.2**). The overlaid ionization enthalpy (ΔH^0_{bind}) of the protonation step was determined as the intersection of the linear regression line obtained by plotting the observed enthalpies of the studied ligands (ΔH^0_{obs}) against the heat of ionization of the corresponding buffers (ΔH^0_{ion}) (**Figure 3.13a**). Interestingly, for ligand **3.3**, which possesses a similar affinity to **3.2** according to our radio-labeled displacement assay, no heat effects at all could be detected in any of the applied buffers. Accordingly, the thermodynamic data obtained from our ITC experiments for **3.1**, **3.2** and **3.5** are listed in **Table 3.3**, while representative thermograms are given in **Table 12.1**. The positive slope of the linear regression reveals the amount of protons, picked up during the binding event. The examined inhibitors **3.2** and **3.5**, on average receive 0.61 ± 0.04 protons per mole of the formed complex, which is in reasonable agreement with the results obtained for **3.1** (0.89) and similar compounds^[118].

Compared to **3.1**, which lacks a substituent addressing the hydrophobic R34/P35-pocket, the thermodynamic profiles of **3.2** and **3.5** reveal very large favorable entropic contributions relative to **3.1** used as a reference (**3.1**→**3.2**: $-T\Delta\Delta S^0 = -36.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, **3.1**→**3.5**: $-T\Delta\Delta S^0 = -33.2 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). In contrast, the enthalpic signals of **3.2** and **3.5** are strongly decreased (**3.1**→**3.2**: $\Delta\Delta H^0 = 39.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$, **3.1**→**3.5**: $\Delta\Delta H^0 = 31.7 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), which to some degree could be due to an enthalpy-entropy compensation as only a slight ΔG^0 variation is observed^[143].

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Table 3.3. Inhibition constants and thermodynamic data at the applied buffers.

Inhibitor	K_i [nM]	K_d [nM]	ΔG^0 [kJ·mol ⁻¹]	Buffer	$\Delta H^0_{\text{obs}}/\Delta H^0_{\text{bind}}$ [kJ·mol ⁻¹]	$-T\Delta S^0$ ^[a] [kJ·mol ⁻¹]
3.1	58 ± 36 ^[12]	52 ± 7 ^[118]	-41.6 ± 0.3 ^[118]	HEPES	-74.8 ± 1.8 ^[118]	34.2 ± 1.9 ^[118]
				Tricin	-66.7 ± 0.1 ^[118]	25.1 ± 0.3 ^[118]
				TRIS	-50.9 ± 0.9 ^[118]	9.3 ± 0.9 ^[118]
				ion. corrected	-93.6	52.0
3.2	217 ± 81 ^[1]	275 ± 49	-37.9 ± 0.4	HEPES	-40.2 ± 2.2	2.4 ± 2.1
				Tricin	-35.6 ± 3.2	-2.7 ± 2.7
				TRIS	-23.5 ± 2.0	-14.1 ± 1.6
				ion. corrected	-53.9	15.9
3.5	2 ± 1 ^[14]	32 ± 9	-43.1 ± 0.8	HEPES	-50.2 ± 3.4	6.2 ± 3.7
				Tricin	-43.2 ± 4.1	0.5 ± 3.3
				TRIS	-34.3 ± 2.2	-8.3 ± 1.4
				ion. corrected	-61.9	18.8

The corresponding plot to get ionization corrected values is shown in **Figure 3.13**. The errors were estimated by means of standard deviation comprising at least triplicate measurements. ^[a] $-T\Delta S^0$ was calculated according the Gibbs-Helmholtz equation.

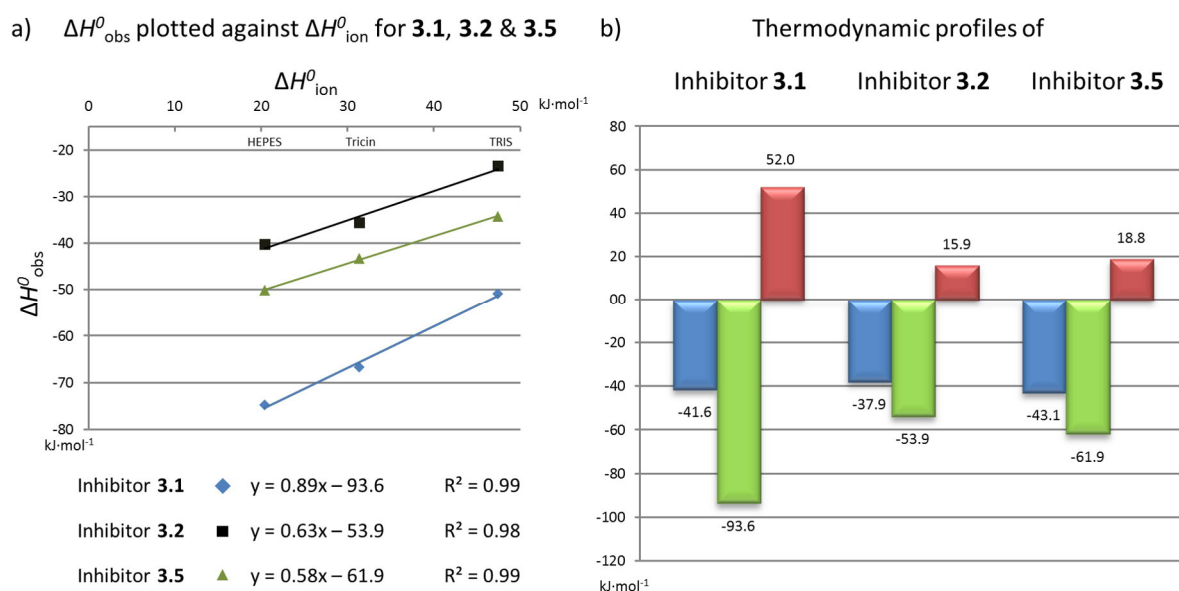


Figure 3.13. Plot of ΔH^0_{obs} against the buffer ΔH^0_{ion} and thermodynamic profiles. **a)** Measured heat signal (ΔH^0_{obs}) is plotted against the ionization enthalpy of the buffers (HEPES, Tricin, TRIS) to extract the corrected enthalpy of binding (ΔH^0_{bind}). Inhibitor **3.1** blue, **3.2** black, and **3.5** green. **b)** Thermodynamic parameters ΔG^0 (blue) and corrected values for ΔH^0_{bind} (green) and $-T\Delta S^0$ (red) in kJ·mol⁻¹.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

As neither **3.2** nor **3.5** are able to exert any influence on dimer architecture, the changes in thermodynamic signature cannot arise from the collapse of the *loop-helix motif*, but only from the occupation of the R34/P35-pocket, the release of water molecules and a number of rearrangements of amino acid side chains in the vicinity of the R34/P35-pocket. As the binding of **3.2** and **3.5** involves the release of several previously well-bound water molecules compared to the binding pose of **3.1**, part of the entropic advantage of **3.2** and **3.5** over **3.1** can be explained. The desolvation of the 4-substituent, in case of **3.5** it even involves a charged group, will require an energy contribution which is supposedly of mainly enthalpic nature. This may explain the enthalpic loss of **3.2** and **3.5** in comparison to the unsubstituted reference **3.1**. The slight conformational adaptations observed in the vicinity of the R34/P35-pocket will likely show a mixed profile partitioning in enthalpic and entropic contributions.

Quite surprisingly, no detectable heat signal could be recorded for the interaction of **3.3** with TGT by directly titrating the ligand to the protein (**Table 12.1**). TGT-**3.3**_{co}^{C2} shows that this inhibitor occupies similar to **3.2** the R34/P35-pocket but, in addition, introduces huge structural rearrangements of the protein thereby destabilizing dimer formation (**Figure 3.2a,b**). If in an ITC experiment no heat signal is recorded, either no binding occurs or the binding event is entirely entropic. The first appears unlikely as we could determine submicromolar binding in our radio-labeled assay and the crystal structure proves binding^[1].

Since any binding event in biological systems becomes enthalpically more favored with increasing temperature^[144], we recorded the ITC titrations at higher temperature up to 308 K and we performed the titrations in HEPES buffer as the superimposed protonation change has the most exothermic contribution under these conditions. Nonetheless, in all titration experiments no heat signal could be detected for **3.3**. As a next step, we tried displacement titrations using the strong enthalpic binder **3.1** as displacement ligand. This strategy followed the idea that the known binding profile of **3.1** will be affected by the properties of ligand **3.3** being displaced in the titration experiment. Consulting our radio-labeled assay, the affinity of **3.1** is only by a factor of 6 more potent than **3.3**. Usually a much larger difference is required for meaningful displacement titration. We started with a solution in which TGT was 100% saturated with **3.3** and used **3.1** as titrant. Unfortunately however, again no heat signal could be recorded (**Table 12.1**). In three subsequent titrations we reduced the saturation of TGT with **3.3** to about 90% and obtained measurable heat signals for binding of **3.1**. These experiments suggest two findings. First of all, the binding constant of **3.3** falls close to that of **3.1** in the ITC experiments. Second, the binding of **3.3** is supposedly overwhelmingly entropy-driven as even at high access of **3.1** the experiments did not result in a measurable signal. It is known that entropy-driven binders lead to difficulties in ITC measurements^[19].

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

As indicated by TGT·**3.3**_{co}^{C2}, we have to keep in mind that during binding and thus also titration, the disorder of the studied system including the ligand, the surrounding solvent, any protonation effects and the changes in the dimer interface all contribute to the observed signal^[144, 145]. It is likely that the binding signal of **3.3** is largely determined by the vast rearrangements involving disorder phenomena of the *loop-helix motif* and residues across the dimer interface. Although we were not able to measure the thermodynamic parameters of the interaction between TGT and **3.3**, the entropic contribution ($-\Delta S^0$) must be large to entirely compensate the enthalpic contribution so that the affinity is exclusively determined by the entropic contribution. The result is the more surprising, as the difference between both inhibitors **3.2** and **3.3** solely consists in a single methyl group, which is present in **3.3** but not in **3.2** and both inhibitors are of similar potency. The costs for desolvating **3.2** and **3.3** are assumed to be quite similar.

3.5 Summary and Conclusion

In the course of a preceding study, we had synthesized the *lin*-benzoguanine derivatives **3.2** (in **Chapter 2: 2.6a**) and **3.3** (in **Chapter 2: 2.6c**), which are both substituted with a furanoside moiety at position 4 and solely differ by a single methyl group attached to the 3'-OH function (**Chapter 2**). As these compounds had been merely designed to create potent active-site inhibitors of TGT, the finding that **3.3** obviously takes influence on the architecture (and probably the stability) of the TGT dimer interface, was unexpected.

The co-crystal structure of TGT with **3.3** reveals a collapse of the so-called *loop-helix motif*, an important component of the dimer interface^[25, 26]. Remarkably, the thermodynamic binding signatures of **3.2** and **3.3** are very different, rendering **3.2** as a more enthalpically favored binder whereas the equipotent **3.3** supposedly exhibits a pure entropically-driven binding signature. The observed structural change results in a considerable reduction of the α -axis and β -angle of the crystal unit cell. Similar changes had been observed with **3.4**, substituted with a long spiking needle also causing the breakdown of the *loop-helix motif*. Remarkably, **3.4** was also successfully soaked into a pre-existing apo-TGT crystal, which neither caused any change in unit cell parameters nor in the geometry of the *loop-helix motif*^[27]. This observation raised the assumption that only co-crystal structures and not those obtained by soaking were able to elucidate the potential influence of the 4-substituent on TGT dimer interface architecture and may reliably reflect the binding pose in solution. In the present study, this assumption was corroborated by the structure of a TGT crystal soaked with **3.3**, which did not show any impact of this ligand on dimer interface integrity.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

We therefore revisited several of our previously investigated ligands (**3.5** to **3.9**) to assess their potential influence on the dimer interface. As they had only been investigated by soaking before^[13, 137] we determined the co-crystal structures of these ligands in complex with TGT in this study. These new structures were systematically compared with those gained by soaking.

Except for **3.5**, all reinvestigated ligands clearly compromise the dimer architecture of bacterial TGT. The 4-substituents of the latter ligands deeply penetrate into the R34/P35-pocket thereby bearing against its distal end, which leads to a vast shift of Thr47. As Thr47 constitutes the first residue of the *loop-helix motif*, its displacement causes the collapse of this motif. In the case of **3.4**, the spiking needle-like 4-substituent directly contacts Thr47 and pushes it to the side^[27]. In contrast, **3.6** does not directly address Thr47 but displaces the close-by Val45, belonging to the *hydrophobic floor* of the R34/P35-pocket. The Val45 shift entails a pronounced movement of the succeeding residues Gly46 and Thr47 leading to the breakdown of the *loop-helix motif*. In the case of ligands **3.3**, **3.7**, **3.8**, and **3.9** the displacement of Thr47 occurs in a still more indirect manner as their 4-substituents initially contact Leu68, another component of the *hydrophobic floor*, and shift this residue toward Val45. As a consequence, Val45 is displaced, which again entails a large movement of Gly46 and Thr47.

The co-crystal structures TGT·**3.5**_{co}^{C2} and TGT·**3.6**_{co}^{C2} reveal that the 4-substituent has to exhibit a particular spatial demand to exert pressure on the distal end of the R34/P35-pocket implicating the movement of Thr47. Ligands **3.5** and **3.6** are highly similar and solely differ by a terminal cyclopentyl (**3.5**) or cyclohexyl ring (**3.6**). Obviously, the cyclopentyl of **3.5** fits perfectly well into the R34/P35-pocket allowing deep immersion into this pocket without any expansion of its distal end. Accordingly, Thr47 is not displaced from its original position and the *loop-helix motif* remains unaffected.

Also the 4-substituent of **3.6** deeply penetrates into this pocket but the accommodation of the slightly more spacious cyclohexyl moiety requires a shift of Val45 involving the displacement of Thr47 and the breakdown of the *loop-helix motif*.

In addition to spatial demand, the lipophilicity of the 4-substituent seems to be a critical feature regarding the ability to impair proper TGT dimer interface formation. This criterion becomes obvious upon the comparison of the co-crystal structures TGT·**3.2**_{co}^{C2} and TGT·**3.3**_{co}^{C2}. Inhibitors **3.2** and **3.3** are endowed with a furanoside moiety, yet in **3.3** the 3'-OH group is methylated. The increased lipophilicity of the produced methoxy group allows the 4-substituent of **3.3** to deeply immerge into the R34/P35-pocket and form van-der-Waals interactions with its *hydrophobic floor*. Thereby it causes an expansion of the binding pocket ultimately leading to the collapse of the *loop-helix motif*.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

In contrast, the slightly more hydrophilic 4-substituent of **3.2** is not able to form equivalent interactions. Consequently, it adopts a more solvent-exposed conformation, which strongly differs from that of **3.3**. Thereby, it neither contacts the *hydrophobic floor* nor Thr47 and the *loop-helix motif* as well as the dimer interface remains intact.

Compared to TGT·**3.1**_{SOAK}^{C2}, both, TGT·**3.3-3.9**_{CO}^{C2/P21} and TGT·**3.3-3.9**_{SOAK}^{C2/P2}, reveal a shift of the Leu68-to-His73 stretch leading to a slight expansion of the R34/P35 binding pocket, which is required to fully accommodate the 4-substituent. TGT·**3.3-3.4**_{SOAK}^{C2} and TGT·**3.6-3.9**_{SOAK}^{C2}, however, do not show the ligand-induced changes in dimer architecture, which are seen in the corresponding co-crystal structures. Obviously, within the lattice of a pre-formed apo-TGT crystal, the geometry of the *loop-helix motif* is largely stabilized so that a ligand, which causes its breakdown in solution, is not able to induce such changes in pre-crystallized TGT. Instead, the 4-substituents of these ligands do not invade as deeply into the R34/P35-pocket as observed in the corresponding co-crystal structures. Therefore, energetically favorable interactions between the ligand's 4-substituents and the protein cannot establish to full extent and the substituents become more flexible and badly defined in the electron density. In some cases, two conformations of the 4-substituent, accompanied by two conformations of the above-mentioned Leu68-to-His73 stretch (TGT·**3.3**_{SOAK}^{C2}, TGT·**3.8**_{SOAK}^{C2}, TGT·**3.9**_{SOAK}^{C2}), become visible. Hereby, one of the two courses observed for the named stretch is highly similar to the one in complex with the 4-unsubstituted ligand **3.1** and forces the 4-substituent into a more solvent-exposed conformation. In contrast, in all co-crystal structures both, the ligand's 4-substituent and the Leu68-to-His73 stretch, are observed in one conformation with the deeply buried 4-substituent being well-defined in the electron density.

Surprisingly, the binding of ligand **3.9** to TGT does not solely interfere with the geometry of the *loop-helix motif* but leads to a total packing rearrangement of both TGT subunits. The resulting *twisted dimer*, never been observed before, displays a subunit contact area which is virtually identical in size to that observed for the conventional homodimer. Although a physiological role for this newly discovered dimer packing of TGT may not be excluded, it is clearly incompatible with the catalytic reaction performed by the enzyme. The crystal structure of *Z. mobilis* TGT in complex with an RNA substrate (PDB entry: 1Q2R^[16]) displays the conventional dimer exclusively observed in TGT crystal structures up to now. For sterical reasons it is, although endowed with two active sites, only able to bind and convert one tRNA molecule at a time^[15, 16, 137]. Thereby, one monomer fulfils catalysis, while the second supports the binding and orientation of the tRNA substrate through its βEβF loop. In the *twisted dimer*, this loop is involved in dimer interface formation and, consequently, not available for tRNA binding (**Figures 3.9b & 3.11b**).

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

Furthermore, if the tRNA substrate bound to one subunit of the *twisted dimer* in the orientation required for catalysis it would inevitably lead to steric clashes with the second subunit (**Figure 3.14a**). Therefore, the *twisted dimer* most likely constitutes a non-productive state of the target enzyme, whose induction and/or stabilization may offer promising opportunities for further drug design. To this end, a cavity which is formed between the two subunits of the *twisted dimer* might prove useful. It is lined by the N-terminal end of loop $\beta 1\alpha 1$, loop $\alpha E\alpha F$, the N-terminal part of helix αF and Arg286 within helix αB of both subunits and connects the two R34/P35-pockets of the *twisted* but not of the conventional dimer (**Figure 3.14b**).

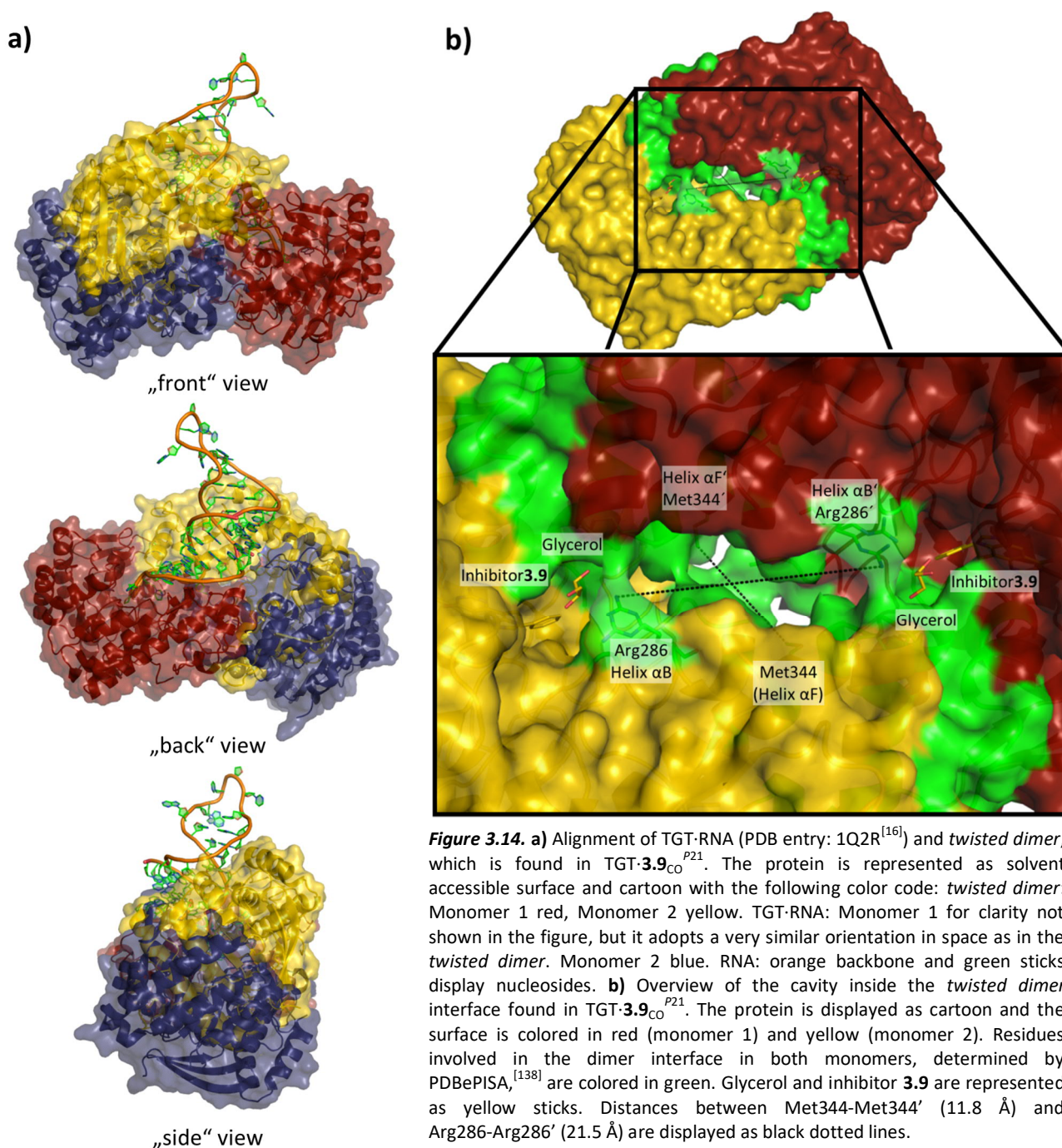


Figure 3.14. a) Alignment of TGT-RNA (PDB entry: 1Q2R^[16]) and *twisted dimer*, which is found in TGT-3.9_{CO}^{P21}. The protein is represented as solvent accessible surface and cartoon with the following color code: *twisted dimer*: Monomer 1 red, Monomer 2 yellow. TGT-RNA: Monomer 1 for clarity not shown in the figure, but it adopts a very similar orientation in space as in the *twisted dimer*. Monomer 2 blue. RNA: orange backbone and green sticks display nucleosides. **b)** Overview of the cavity inside the *twisted dimer* interface found in TGT-3.9_{CO}^{P21}. The protein is displayed as cartoon and the surface is colored in red (monomer 1) and yellow (monomer 2). Residues involved in the dimer interface in both monomers, determined by PDBePISA,^[138] are colored in green. Glycerol and inhibitor 3.9 are represented as yellow sticks. Distances between Met344-Met344' (11.8 Å) and Arg286-Arg286' (21.5 Å) are displayed as black dotted lines.

3. Soaking versus Co-crystallization: Only the Latter Discloses Major Interface Rearrangements of a Homodimeric tRNA-Binding Protein upon Ligand Binding

In order to correlate the *loop-helix motif* disturbing potential of our inhibitors with their ability to destabilize the TGT homodimer interface, relative proportions of TGT monomers were measured by native MS in the presence of each ligand in saturating concentration. While **3.1**, which lacks any 4-substituent, and **3.2** and **3.5**, which exert no influence on the geometry of the *loop-helix motif*, were not able to produce a reasonable increased amount of monomer, **3.3**, **3.7**, **3.8**, and **3.9** were. As mentioned in the Results & Discussion section, the complete failure of **3.6** to negatively influence dimer formation is likely to be caused by its low solubility in the 1 M NH₄Ac pH 7.5 buffer, which is mandatory for native MS. For **3.4**, a slight influence can be assigned, however it is at the border of significance. Yet, also the influence on TGT dimer stability observed for **3.3**, **3.7**, **3.8**, and **3.9** was apparently low in every single case. At least in part, this is clearly due to the non-physiologically high protein concentration used in native MS, which, according to the law of mass action, strongly favors homodimer over monomer formation. Performing these experiments using TGT monomer concentrations of less than 2.5 µM unfortunately led to insufficient signal-over-noise ratios, which stem from technical sensitivity limits and ligand-induced heterogeneity, and make submicromolar analyses impossible.

Noteworthy, the most significant increase of normalized monomer proportion was measured for **3.9** inducing the formation of the *twisted dimer* upon binding to TGT. During TGT crystallization the presence of **3.9** in saturating concentration exclusively leads to crystals with space group *P2₁* (consisting of the *twisted dimer*) even when apo-TGT micro-crystals with space group *C2* are added. Presumably in solution, this inhibitor solely allows the presence of the *twisted dimer* since even low amounts of the conventional dimer would unavoidably result in the growth of pre-formed *C2* seed crystals. Although native MS does not allow to directly uncover which dimer form is actually present in solution, the increase of relative monomer proportion caused by **3.9** suggests a lower stability of the *twisted dimer* in comparison to the conventional one.

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche *Prodrug*-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

4.1 Vorwort

Alle in diesem Kapitel neu präsentierten Liganden (**4.1** – **4.6**) wurden in Kooperation mit Dr. Christoph Hohn (Arbeitsgruppe Prof. Dr. François Diederich, ETH Zürich, Schweiz) entwickelt und von ihm synthetisiert. Die PAMPA Messungen der Liganden wurden von Virginie Micallef durchgeführt (F. Hoffmann-La Roche AG, Schweiz). Die Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT, kinetische Radioaktivmessungen und röntgenkristallographische Untersuchungen wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt.

4. Carbamat-geschützte lin-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

4.2 Einleitung

4.2.1 Prodrugs in der Pharmazeutischen Industrie

Schon 1958 wurde die *Prodrug*-Strategie von Adrien Albert mit der Absicht entwickelt, physikochemische Eigenschaften von Wirkstoffen zu verbessern und so die Toxizität der Stoffe zu reduzieren^[146]. Allgemein ist ein *Prodrug* ein inaktives oder weniger wirksames Derivat des eigentlichen Wirkstoffes, das durch enzymatische und/oder chemische Metabolisierung in die eigentliche Wirkform umgewandelt wird und so seine volle pharmakologische Wirkung entfalten kann (**Abbildung 4.1**). Durch die Anwendung von *Prodrug*-Strategien können ADMET-Eigenschaften (*Absorption* (Adsorption), *Distribution* (Verteilung), *Metabolism* (Metabolisierung), *Excretion* (Ausscheidung) und *Toxicity* (Toxizität)) verbessert werden. Es kann zum Beispiel die Freisetzung eines Wirkstoffes mit geeigneter Geschwindigkeit am gewünschten Wirkort ohne ein toxisch wirkendes Abspaltprodukt erreicht werden^[147, 148].

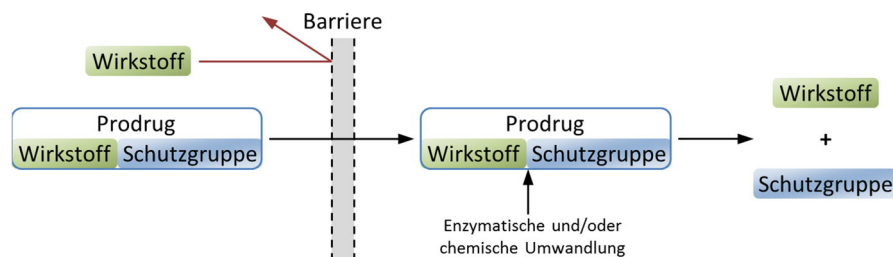


Abbildung 4.1. Vereinfachte Darstellung des *Prodrug*-Prinzips basierend auf Rautio et al. (2008)^[149].

Das Potential von *Prodrugs*, Defizite wie eine geringe chemische oder metabolische Stabilität, verminderte Wasserlöslichkeit, schlechte Bioverfügbarkeit oder geringe Membranpermeabilität zu überwinden, ist beachtlich. Tatsächlich wurde zwischen 2001 und 2002 bei 14% aller weltweit zugelassenen Arzneimittel eine *Prodrug*-Strategie angewandt^[148]. Viele funktionelle Gruppen sind als *Prodrug*-Form darstellbar. Die am häufigsten verwendeten funktionellen Gruppen, die in einem *Prodrug* kaschiert werden können, sind Carboxyl-, Hydroxyl-, Amino-, Phosphat-, Phosphonat- und Carbonylgruppen (**Abbildung 4.2**).

4. Carbamat-geschützte lin-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

Typische *Prodrugs*, die aus den genannten funktionellen Gruppen resultieren, sind Ester, Amide, Phosphate, Oxime, Carbonate und Carbamate. Allerdings sind nahezu 50% aller vermarkteten *Prodrugs* Ester, die so Carboxyl- oder Hydroxylgruppen maskieren und durch enzymatische Hydrolyse gespalten werden können^[150]. Die Aktivierung zur Wirkform und somit die Spaltung des Esters wird in diesem Fall durch Esterasen im Körper gewährleistet^[151].

Die vergleichsweise hohe enzymatische Stabilität von Amiden als *Prodrug* macht diese hingegen weniger attraktiv für den Schutz von Amino- und Carboxylgruppen. Die Amidbindung kann jedoch durch ubiquitär verbreitete Carboxylesterasen^[152], Peptidasen oder Proteasen gespalten werden^[153].

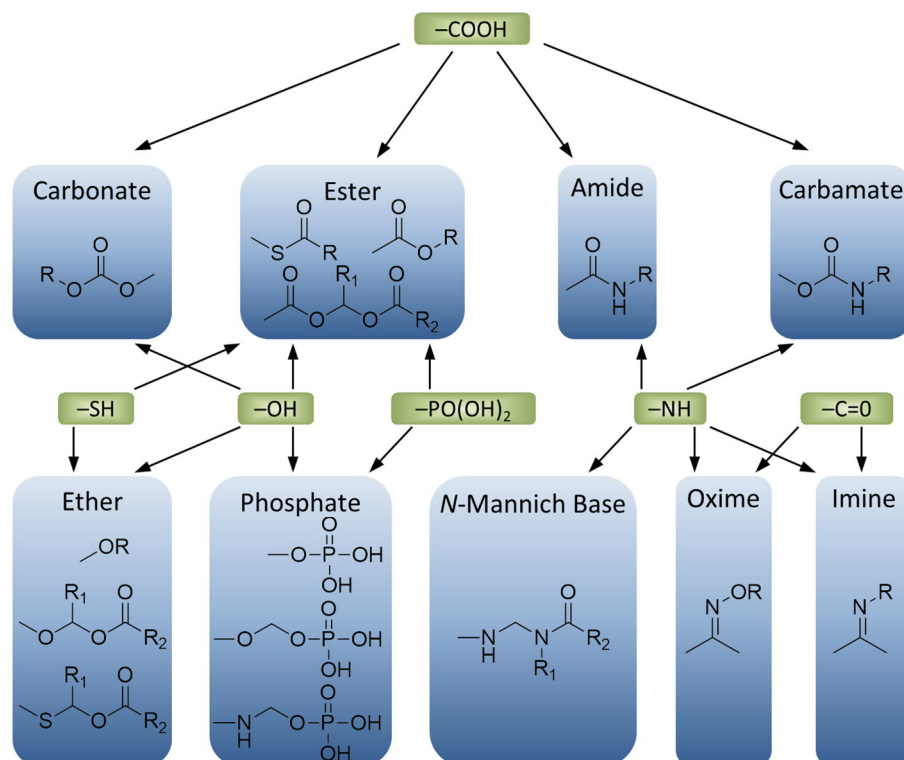


Abbildung 4.2. Übliche funktionelle Gruppen von Wirkstoffen (grün hinterlegt) und geeignete Schutzgruppen der korrespondierenden *Prodrugs* (blau hinterlegt) basierend auf Rautio et al. (2008)^[149].

Oxime, welche die *Prodrug*-Form von Ketonen, Amidinen und Guanidinen sind, können durch Cytochrom P450-Isoenzyme (CYP450) aktiviert werden^[154, 155]. Diese *Prodrug*-Form wird vor allem verwendet, wenn bei Wirkstoffen keine Hydroxyl-, Amino- oder Carboxylfunktionalitäten vorliegen.

4. Carbamat-geschützte lin-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

Ein erfolgreiches Beispiel bei dem eine Amidinfunktionalität in ein Amidoxim als *Prodrug*-Form umgesetzt wurde, ist das *Prodrug* Dabigatranetexilat (Pradaxa®; Boehringer Ingelheim). Nach der katalysierten Hydrolyse durch Esterasen in Blutplasma und Leber liegt der enthaltene Amidin-Wirkstoff Dabigatran frei vor (**Abbildung 4.3**). Dabigatran gehört zu den oral verfügbaren direkten Thrombininhibitoren, die zur Hemmung der Blutgerinnung und dadurch zum Beispiel zur Schlaganfallprophylaxe angewendet werden können^[156-158].

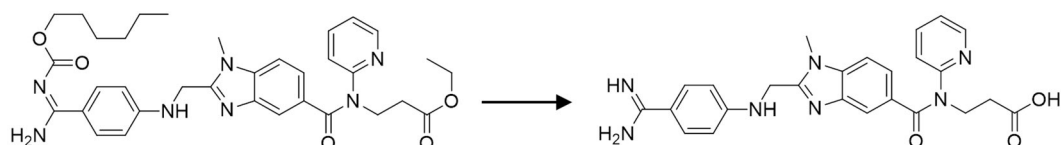


Abbildung 4.3. Dabigatranetexilat (*Prodrug*) und die Wirkform nach katalysierter Hydrolyse (Dabigatran).

Carbonate und Carbamate werden als *Prodrug*-Form für Carboxyl-, Hydroxyl- und Aminofunktionalitäten angewendet. Generell sind diese *Prodrug*-Formen stabiler gegenüber enzymatischem Abbau, als die bisher genannten *Prodrug*-Formen.

Dafür hydrolysieren Carbonate und Carbamate schneller als Ester und dennoch sind Esterasen notwendig, um die aktive Form zu erhalten^[152]. Ein erfolgreiches Beispiel, bei dem ein Carbamat als *Prodrug*-Form angewandt wurde, ist bei dem Nukleosid-Zytostatikum Capecitabin (Xeloda®; F. Hoffmann-La Roche AG) zu finden. Capecitabin benötigt eine Kaskade von drei aufeinander folgenden enzymatischen Reaktionen, um die zytotoxische Wirkform 5-Fluorouracil selektiv im Tumorgewebe freizusetzen (**Abbildung 4.4**)^[159-161]. Das *Prodrug* wird im Dünndarm absorbiert und erfährt die finale biologische Umwandlung in die Wirkform erst in den Tumorzellen.

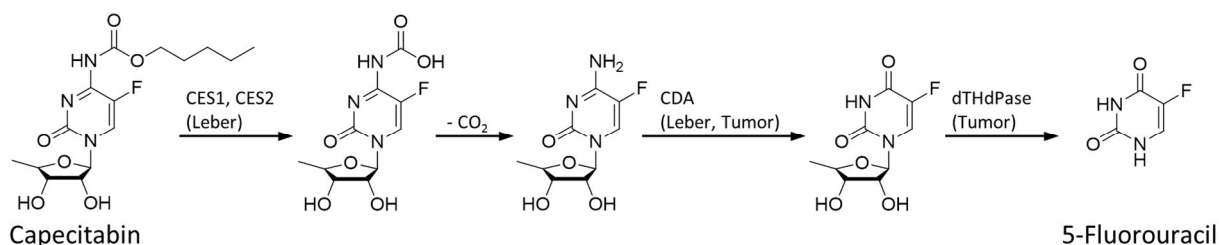


Abbildung 4.4. Enzymatische Aktivierung von Capecitabin zu 5-Fluorouracil. CES1 und CES2: Carboxylesterase 1 und 2. CDA: Cytidineaminase. dThDPase: Thymidinphosphorylase.

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

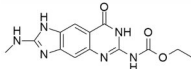
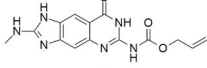
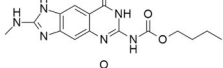
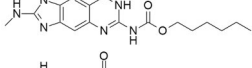
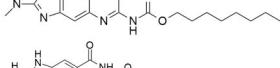
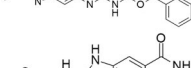
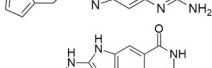
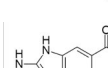
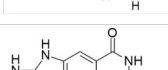
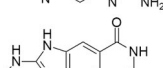
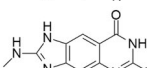
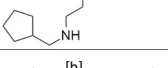
4.2.2 Design der Carbamat-geschützten *lin*-Benzoguanine

Obwohl mit den *lin*-Benzoguaninen hochaffine Inhibitoren der *Z. mobilis* TGT vorliegen, die u.a. auch die Seitentaschen (Ribose-33- und Ribose-34-Tasche) der Guanin-34/preQ₁-Bindetasche adressierbar machen und mit denen sogar ein zusätzlicher allosterischer Wirkmechanismus möglich ist (**Kapitel 3 & 7**)^[12, 13, 15, 114, 116], besitzen diese Liganden einen entscheidenden Nachteil. Damit die *lin*-Benzoguanine das TGT-Enzym hemmen können, müssen sie zum einen die Zellmembran der *Shigellen* und zum anderen die der humanen Endothelzellen überwinden. Aufgrund der Protonierung des Stickstoffs N(5) des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts und somit einer positiven Ladung, besitzen die Liganden keine ausreichende Membranpermeabilität^[114, 118]. Des Weiteren ist die geringe Löslichkeit der *lin*-Benzoguanine ein Problem für den Einsatz unter physiologischen Bedingungen^[114].

In dieser Hinsicht besitzt das Konzept, das *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst in ein *Prodrug* zu überführen, ein enormes Potential seine physikochemischen Anfälligkeiten zu verbessern. Die exozyklische Aminogruppe an C(6) offeriert die Möglichkeit zur Bildung eines Carbamat-*Prodrugs*. Des Weiteren wäre durch die intramolekulare Wasserstoffbrücke (H-Brücke) zwischen dem Stickstoff N(7) und der Carbonylgruppe des Carbamats die Hydrolyse begünstigt (**Abbildung 4.5**). Die eigentliche Aktivierung zur Wirkform würde allerdings Esterasen erfordern, die die Freisetzung des Alkohols und der Carbaminsäure katalysieren^[152]. Die zuletzt genannte Funktionalität ist chemisch instabil, was zur Freisetzung von CO₂ und der freien Aminogruppe des Wirkstoffs führt (**4.10; Tabelle 4.1; Abbildung 4.5**).

4. Carbamat-geschützte lin-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

Tabelle 4.1. Struktur, physikochemische Eigenschaften und Ergebnisse der PAMPA Messungen.

Ligand	Struktur	MW [g·mol ⁻¹] ^[a]	clogD ^[b] (pH 7.4)	score [Pe/10 ⁻⁶ cm·s ⁻¹] ^[c]	PAMPA			Kategorie ^[c]
					% Donor ^[c]	% Membran ^[c]	% Akzeptor ^[c]	
4.1		302.29	-0.02	0.05	96.40	3.30	0.20	I
4.2		314.30	0.13	0.12	94.80	4.70	0.50	I
4.3		330.34	0.46	0.10	87.90	11.70	0.40	I
4.4		358.39	1.58	0.00	46.90	53.00	0.0	m2h
4.5		386.45	2.61	n.b ^[d]	n.b ^[d]	n.b ^[d]	n.b ^[d]	n.b ^[d]
4.6		364.36	0.55	0.54	67.30	31.33	1.67	m2h
4.7		312.35	1.09	0.00	Anreicherung in der Membran.			m2h ^[e]
4.8		244.25	0.18	0.00				I ^[e]
4.9		258.28	0.72	0.05				I ^[e]
4.10		230.23	-0.33	0.00	Anreicherung in der Membran.			m2h ^[e]
4.11		215.21	0.18	0.00				I ^[e]
4.12		355.44	-0.87	0.00				I ^[e]

^[a] Molekulargewicht, ^[b] Logarithmischer Verteilungskoeffizient für Oktanol/Wasser bei pH 7.4, berechnet mit ACD/Labs, Version 12.01, 2009. ^[c] PAMPA score, gemessener Prozentsatz des Liganden in Donorlösung, Membran und Akzeptorlösung. Die PAMPA Kategorie unterscheidet zwischen „low“ (I) und „medium2high“ (m2h) unter Berücksichtigung der Akzeptorkonzentration und einer möglichen Akkumulation in der Membran. ^[d] n.b. nicht bestimmt, da UV Absorption zu gering. ^[e] Barandun et al. (2012)^[114].

Der Carbamat Substituent wurde anhand von clogD_{7.4}-Werten (Lipophilie) und Molekulargewichten ausgewählt, welche als die wichtigsten Faktoren für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane angesehen werden^[162]. Wenlock *et al.* (2003)^[163] berechneten, dass die bis dahin vermarkteten oralen Wirkstoffe einen durchschnittlichen clogD-Wert von 4.3 aufwiesen. Basierend auf einem Datensatz von annähernd 10.000 Verbindungen definierten Waring *et al.* ein Optimum zwischen clogD-Wert und Molekulargewicht, was zu einer 50% Wahrscheinlichkeit führen sollte, eine hohe Permeabilität zu erreichen (**Tabelle 4.2**)^[162]. Die passive Diffusion durch eine Membran wurde damals mittels zellfreien PAMPA Messungen (*Parallel Artificial Membrane Permeability Assay*) ermittelt^[164].

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

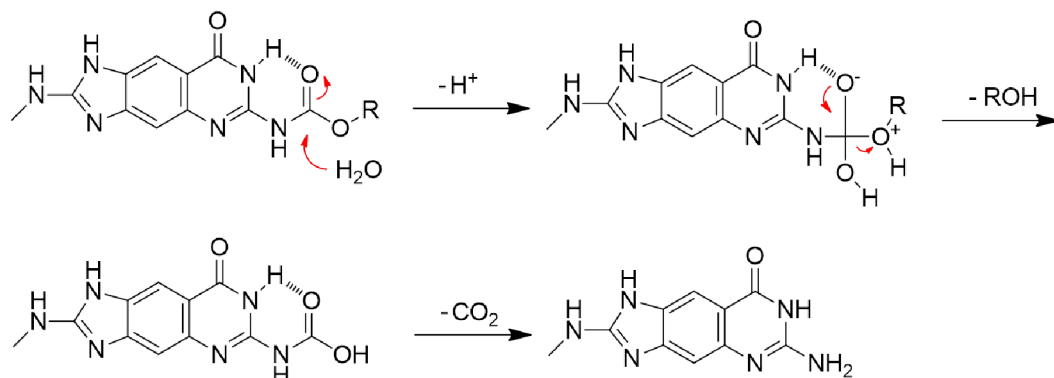


Abbildung 4.5. Postulierte Aktivierung der Carbamat-geschützten *lin*-Benzoguanine, die durch eine intramolekulare H-Brücke zwischen dem Stickstoff N(7) und der Carbonylgruppe des Carbamats begünstigt wird.

Tabelle 4.2. Permeabilitätsregel von Astra Zeneca

MW (g mol ⁻¹)	AZlogD
< 300	> 0.5
300 – 350	> 1.1
350 – 400	> 1.7
400 – 450	> 3.1
450 – 500	> 3.4
> 500	> 4.5

Permeabilitätsregel, die für ein gegebenes Molekulargewicht unter Berücksichtigung des AZlogD Wertes (Astra Zeneca logD) eine 50% Wahrscheinlichkeit für eine hohe Permeabilität vorhersagt^[162].

Durch die Variation der Größe und Länge des Carbamat-Substituenten von **4.1** – **4.6** ist es möglich, sowohl ein breites Spektrum an $\log D_{7.4}$ -Werten zwischen -0.02 und 2.61, als auch Molekulargewichte zwischen 302.29 und 386.45 g·mol⁻¹ abzudecken (**Tabelle 4.1**). Folglich sind unter Beachtung der **Tabelle 4.2** Ligand **4.4** (MW: 358.39 g·mol⁻¹; $\log D_{7.4}$: 1.58) und Ligand **5** (MW: 386.45 g·mol⁻¹; $\log D_{7.4}$: 2.61) die vielversprechendsten Kandidaten für die passive Membranpermeabilität.

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

4.3 Ergebnisse und Diskussion

4.3.1 Physikochemische Ergebnisse

Die passive Membrangängigkeit der Verbindungen **4.1** – **4.6** wurden mittels PAMPA Messungen ermittelt^[164]. Ein Drei-Komponenten-Modell simuliert dort die passive Diffusion durch eine Membran. Der Ligand diffundiert, wenn möglich, von einer Donorlösung durch einen mit einer Phospholipid-Schicht versehenen Filter, der die Membran simuliert, zur Akzeptorlösung (**Abbildung 4.6**).

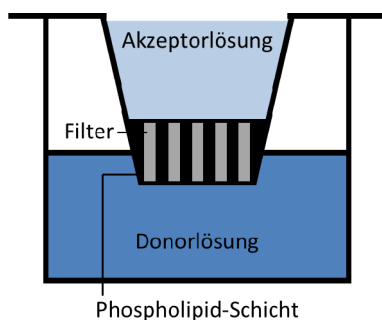


Abbildung 4.6. Schematische Darstellung des PAMPA Assays basierend auf Brandl et al. (2007)^[165].

Die Donor-, Membran- und Akzeptorkonzentration (**Tabelle 4.1**) wird über die Zeit mittels UV Absorption bestimmt. Die Liganden werden nach „low“ (l) und „medium2high“ (m2h) unter Berücksichtigung der Akzeptorkonzentration und einer möglichen Akkumulation in der Membran kategorisiert. Während die Verbindungen **4.1** – **4.3** in die Kategorie „low“ fallen, wurden die Verbindungen **4.4** und **4.6** als „medium2high“ kategorisiert. Die Hexylkette des Carbamatrests von **4.4** verursacht eine hohe Anreicherung der Verbindung von bis zu 53% in der künstlichen Membran. Als Konsequenz konnten allerdings keine messbaren Konzentrationen dieser Verbindung in der Akzeptorlösung detektiert werden. Dennoch wurde aufgrund der hohen Konzentrationen des Liganden in der Membran **4.4** als „m2h“ kategorisiert. Auf der anderen Seite konnten 1.67% von **4.6** in der Akzeptorlösung festgestellt werden. Innerhalb des TGT-Projektes ist dies das erste Mal, dass ein Ligand als „m2h“ kategorisiert wurde, ohne die Membrankonzentration zu berücksichtigen.

Die alleinige Betrachtung des $\log D_{7,4}$ -Werts als Kriterium für eine gute Membrangängigkeit ist für die Carbamat-geschützten *lin*-Benzoguanine (**4.1** - **4.6**) nicht ausreichend. Die Form und die Größe der Carbamatreste sollten auch für ein erfolgreiches Prodrug-Design berücksichtigt werden. Offensichtlich korrelieren die $\log D_{7,4}$ -Werte der Prodrug-Serie direkt mit der Akkumulation der Liganden in der Membran und nicht mit der Membranpermeabilität bzw. der gemessenen Konzentration der Liganden in der Donorlösung.

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

Obwohl der $\text{clogD}_{7.4}$ -Wert des Benzyl-substituierten *Prodrugs* **4.6** viel niedriger als der des Hexyl-substituierten *Prodrugs* **4.4** ist, erhöht die Einführung des starren Phenylrings in **4.6** die Membranpermeabilität. Letztendlich erscheint es entscheidend, dass das spezifische Kaschieren der potentiellen positiven Ladung der exozyklischen Aminogruppe an C(6) des *lin*-Benzoguanins von maßgeblicher Bedeutung für das *Prodrug*-Design ist, da der mit einem aromatischen Thiophenyl-Substituenten ausgestattete *lin*-Benzoguanin **4.7** keine Membranpermeabilität zeigt, obwohl die Verbindung einen $\text{clogD}_{7.4}$ -Wert von 1.09 aufweist^[114]. Sie wird allerdings weiterhin die positive Ladung im Aminopyrimidinring aufweisen.

4.3.2 Kokristallstrukturen der Carbamat-geschützten *lin*-Benzoguanine

Aufgrund der bekannten Flexibilität und Anpassungsfähigkeit der *Z. mobilis* TGT Bindetaschen (**Kapitel 3, 5 & 7**) wurden die Verbindungen **4.1** – **4.6** mit dem TGT-Enzym kokristallisiert. Damit sollte auch untersucht werden, ob die Derivate mit der *Prodrug*-Gruppierung weiterhin an das Enzym binden können. Von **4.1** und **4.2** konnten Kokristallstrukturen mit eindeutig interpretierbarer Differenzelektronendichte der Verbindungen in der Bindetasche bei hohen Auflösungen der Datensätze von 1.38 Å und 1.37 Å erhalten werden (TGT·**4.1**_{co}^{C2} und TGT·**4.2**_{co}^{C2}). Detaillierte Informationen zu den deponierten Datensätzen und Verfeinerungsstatistiken sind in **Tabelle 12.2** aufgelistet. Details zu der Bestimmung der Bindungsaffinitäten und zu den röntgenkristallographischen Untersuchungen finden sich im **Kapitel 11**. In TGT·**4.1**_{co}^{C2} und TGT·**4.2**_{co}^{C2} zeigen die Liganden die bekannten H-Brücken zu den Carbonylgruppen von Ala232 und Leu231, als auch zum Amidstickstoff von Gly230 und der Seitenkette von Gln203 (**Abbildung 4.7**).

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

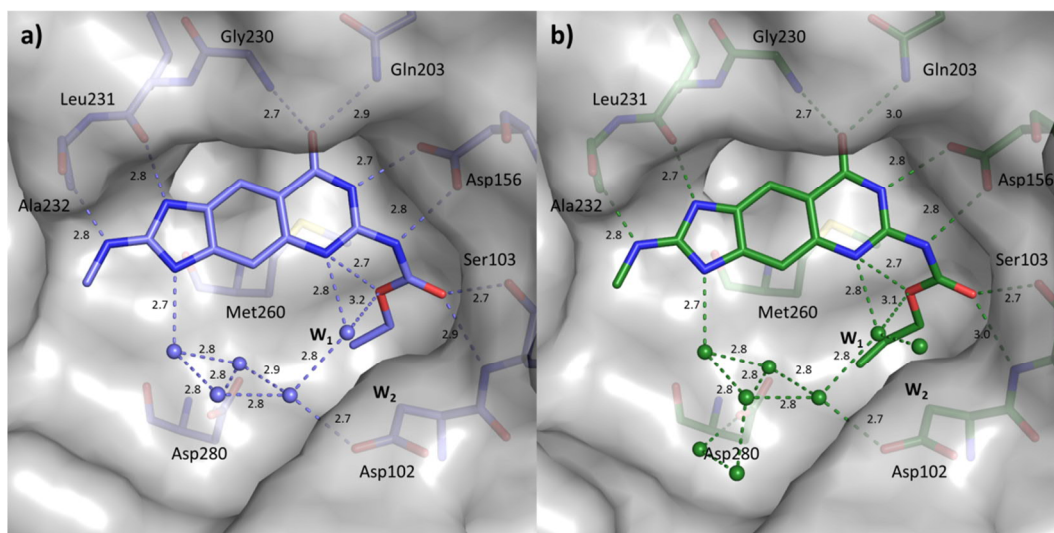


Abbildung 4.7. Kokristallstrukturen von **a) 4.1** (TGT-**4.1**_{CO}^{C2}; PDB ID: 5JGM, Kohlenstoff hellblau) und **b) 4.2** (TGT-**4.2**_{CO}^{C2}; PDB ID: 5JGO, Kohlenstoff grün). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken sind als gestrichelte Linien dargestellt und Distanzen in Ångström (Å) angegeben. Zur besseren Übersicht ist Tyr106 nicht dargestellt. Wassermoleküle sind als hellblaue bzw. grüne Kugeln dargestellt.

Asp156 bildet H-Brücken zu dem Stickstoff N(7) des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts (2.7 und 2.8 Å) und zum Stickstoff der exozyklischen Carbamatgruppe (2.8 Å) in TGT-**4.1**_{CO}^{C2} und TGT-**4.2**_{CO}^{C2} aus. Aufgrund der räumlichen Ausdehnung der Carbamatgruppen nimmt Asp102 die Geometrie des apo-TGT Enzyms ein (PDB ID: 1POD, 1.90 Å^[86]) und ragt nicht in Richtung der Guanin-34/preQ₁-Bindetasche. Die gleiche Konformation tritt auch in der Kristallstruktur mit dem *lin*-Benzohypoxanthin (TGT-**4.11**_{SOAK}^{C2}) auf^[114]. Dort kann sich ein Wassernetzwerk zwischen Asp102 und Asp156 ausbilden (**Abbildung 4.10a**), welches im vorliegenden Fall hingegen teilweise durch die Carbamatgruppen der Liganden in TGT-**4.1**_{CO}^{C2} und TGT-**4.2**_{CO}^{C2} ersetzt wird.

Die Carbamatgruppen von **4.1** und **4.2** interagieren über zwei H-Brücken sowohl mit der Hydroxylgruppen der Seitenkette (2.7 Å), als auch mit dem Amidstickstoff von Ser103 (2.9 Å und 3.0 Å). Die Ebene der Carbamateinheit nimmt eine um ca. 55° gedrehte Formation zu der Ebene des trizyklischen *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts ein, was auf ein partielles Aufreißen der Konjugation zwischen den ungesättigten Gruppen hinweist. Der begrenzte Raum in der Bindetasche verhindert eine Koplanarität der Carbamatgruppe und dem trizyklischen Grundgerüsts, wodurch in beiden Strukturen die *Prodrug* Schutzgruppe eine *syn*-Konformation einnimmt (**Abbildung 4.8**). Die in Lösung vermutlich stabilere *anti*-Konformation kann aus sterischen Gründen nicht eingenommen werden, da dies einen Zusammenstoß mit Asp156 zur Folge hätte.

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

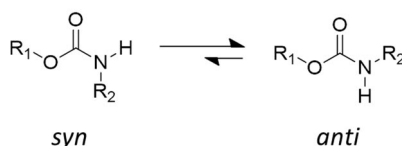


Abbildung 8. Mögliche Rotamere der Carbamatfunktion.

Im Vergleich zu **4.12**, das an Position C(4) des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts ein N-(Cyclopentylmethyl)ethylamin-Substituent trägt^[13] (**Kapitel 3**) und die Ribose-34-Seitentasse adressiert, orientieren sich auch die Carbamatreste an C(6) von **4.1** und **4.2** aufgrund der eingenommenen *syn*-Konformation in Richtung auf diese Seitentasse. Eine Überlagerung der Strukturen zeigt allerdings, dass die Seitentasse aus einer anderen Richtung adressiert wird (**Abbildung 4.9**).

Das Wassernetzwerk zwischen Asp102 und Asp156, welches in der Kristallstruktur mit dem *lin*-Benzohypoxanthin (TGT-**4.11**_{SOAK}^{C2}) zu finden ist, besteht unter anderem aus den vier Wassermolekülen (**W**₁ – **W**₄)^[114] (**Abbildung 4.10a**). Die Wassermoleküle **W**₁ und **W**₂ werden durch die Carbamatgruppe in TGT-**4.1**_{CO}^{C2} und TGT-**4.2**_{CO}^{C2} verdrängt. Der Carbonylsauerstoff des Carbamats liegt dabei an der Position des Wassermoleküls **W**₂. Das Wassermolekül **W**₄ wiederum wird zusätzlich zu dem Stickstoff N(5) des trizyklischen Grundgerüsts (2.8 Å) von dem zweiten Sauerstoff des Carbamats in einer schwachen Wechselwirkung stabilisiert (3.1 – 3.2 Å). Dabei kann das Wassermolekül **W**₄ weiterhin eine H-Brücke zu dem Wassermolekül **W**₃ ausbilden (2.6 – 2.7 Å). Im Vergleich zum *lin*-Benzohypoxanthin **4.11**, bei dem das Wassernetzwerk intakt bleibt, können die Carbamat-geschützten Liganden dieses Netzwerk zum Teil ersetzen und zusätzlich zwei weitere H-Brücken zu Ser103 ausbilden. Dies ist unserer Einschätzung nach der Grund für die um den Faktor 8 verbesserte Affinität von **4.1** und **4.2** (**Tabelle 4.3**) im Vergleich zu dem *lin*-Benzohypoxanthin (**4.11**).

Tabelle 4.3. Bindungsaffinitäten der untersuchten Liganden.

Ligand	K_i [μM]
4.1	0.808 ± 0.098
4.2	0.791 ± 0.092
4.8	28.05 ± 11.97 ^[a]
4.9	40.83 ± 4.27 ^[a]
4.10	0.058 ± 0.036 ^[b]
4.11	6.5 ± 2.9 ^[a]

Bindungsaffinitäten anhand von kinetischen Radioaktivmessungen bestimmt.

^[a]Barandun et al. (2012)^[114], ^[b]Hörtner et al. (2007)^[12].

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

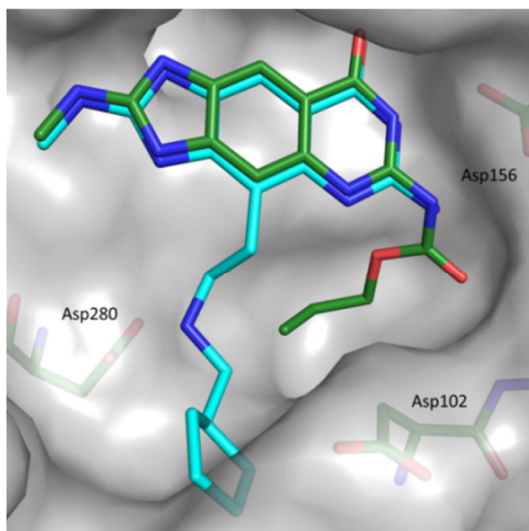


Abbildung 4.9. Überlagerung von TGT-4.2_{CO}^{C2} (dunkelgrün, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau) und TGT-4.12_{CO}^{C2} (entspricht der Struktur TGT-3.5_{CO}^{C2} aus Kapitel 3; PDB ID: 5I00, cyan). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau.

Im Vergleich zu dem *lin*-Benzoguanin **4.10**, der eigentlichen freizusetzenden Wirkform, sind die Affinitäten der beiden kristallographisch untersuchten Carbamat-geschützten Liganden **4.1** und **4.2** um den Faktor 13 reduziert. Da nahezu alle Interaktionen der Liganden zum Protein identisch sind, liegt es nahe, dass die stärkere Affinität des *lin*-Benzoguanins **4.10** allein auf die ladungsgestützten Interaktionen zu Asp102 zurückzuführen ist (**Abbildung 4.10b**)^[114].

Der Ligand **4.8**, der wie **4.11** ebenfalls im Jahr 2012 von Barandun *et al.* untersucht wurde, besitzt an der exozyklischen Aminogruppe an C(6) eine zusätzliche Methylgruppe. In der Kristallstruktur (TGT-4.8_{CO}^{C2}) verdrängt diese Methylgruppe des Liganden die Wassermoleküle **W₂** und **W₄** aus deren ursprünglichen Positionen. Asp102 nimmt eine von dem Liganden wegrotierte Konformation ein. Die Wassermoleküle **W₂** und **W₄** sind nun in TGT-4.8_{CO}^{C2} zum Teil einer eher hydrophoben Umgebung ausgesetzt^[114] (**Abbildung 4.10c**). Daher ist die Affinität von **4.8** im Vergleich mit dem *lin*-Benzohypoxanthin **4.11** auch um den Faktor 4 reduziert.

Eine weitere Methylgruppe bei **4.9**, die zu einer Ethylaminogruppe an C(6) führt, hat sogar zur Folge, dass Asp156 und Ser103 nicht mehr solvatisiert vorliegen. Wassermolekül **W₂** wird aus der Bindetasche verdrängt und im Vergleich zum *lin*-Benzohypoxanthin **4.11** ist ein Affinitätsverlust vom Faktor 6 feststellbar (**Tabelle 4.3; Abbildung 4.10c**). Der Vergleich zwischen den Carbamat-substituierten *lin*-Benzoguaninen **4.1/4.2** und den alkylierten Verbindungen **4.8/4.9** zeigt, dass die zwei zusätzlichen H-Brücken von **4.1** und **4.2** zu Ser103 eine Affinitätssteigerung um den Faktor 35 bzw. 50 nach sich zieht.

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

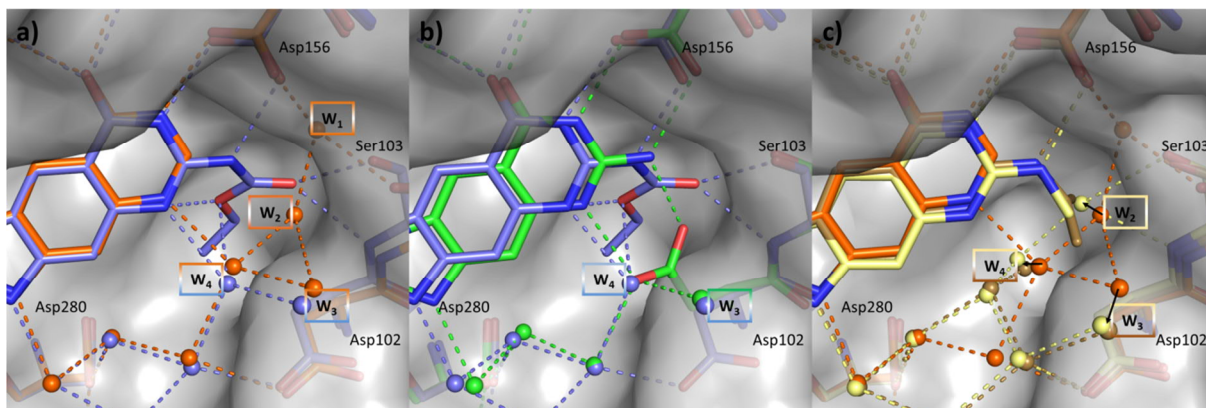


Abbildung 4.10. Überlagerung von **a)** TGT·4.1_{CO}^{C2} (hellblau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau) und TGT·4.11_{CO}^{C2} (PDB ID: 3S1G^[114]; orange), **b)** TGT·4.1_{CO}^{C2} (hellblau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau) und TGT·4.10_{SOAK}^{C2} (PDB ID: 4PUK^[118], hellgrün), **c)** TGT·4.8_{CO}^{C2} (PDB ID: 3RR4^[114], hellgelb, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau), TGT·4.9_{CO}^{C2} (PDB ID: 3TLL^[114], braun) und TGT·4.11_{CO}^{C2} (orange). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau. H-Brücken sind als gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.5 und 3.5 Å). Met260 und Tyr106 sind zur besseren Übersicht weggelassen. Wassermoleküle sind als Kugeln dargestellt und im entsprechenden Komplex gefärbt. Wassermoleküle des Wassernetzes (**W**₁ – **W**₄) sind in der Farbe des Komplexes umrandet, wenn sie in den Kristallstrukturen detektierbar waren: in TGT·4.1_{CO}^{C2}: **W**₃ und **W**₄, in TGT·4.11_{SOAK}^{C2}: **W**₁ – **W**₄, in TGT·4.10_{SOAK}^{C2}: **W**₃, in TGT·4.8_{CO}^{C2}: **W**₂ – **W**₄ und in TGT·4.9_{CO}^{C2}: **W**₃ und **W**₄.

4.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde das Design und die physikochemische Charakterisierung einer Carbamat-geschützten *lin*-Benzoguanin Serie hinsichtlich ihres Potentials als mögliche *Prodrug*-Form beschrieben. Des Weiteren konnten mit den TGT·4.1_{CO}^{C2} und TGT·4.2_{CO}^{C2} Kokristalle mit komplett definierter Differenzelektronendichte für die Liganden erhalten werden.

Bezüglich der physikochemischen Eigenschaften zeigte die Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanin Serie keine direkte Korrelation zwischen $\log D_{7,4}$ -Wert und Membranpermeabilität, sondern nur eine Korrelation zwischen $\log D_{7,4}$ -Wert und der Anreicherung in der künstlichen Membran. Trotzdem stellen die Liganden **4.4** und **4.6** wegen ihrer günstigen Bewertung im PAMPA Assay vielversprechende Kandidaten zur weiteren Optimierung der *Prodrug*-Strategie dar. Beide Verbindungen wurden aus unterschiedlichen Gründen als relativ günstig klassifiziert. Positiv bewertet wird, dass **4.4** mit seiner Hexylkette am Carbamat eine hohe Anreicherung in der künstlichen Membran verursacht. Andererseits erscheint das Benzyl-substituierte Carbamat **4.6** günstig, da es durch die Membran diffundiert und dies zu einer entsprechenden Konzentration von 1.67% in der Akzeptorlösung führt, was einen PAMPA Score von 0.54 zur Folge hat.

4. Carbamat-geschützte *lin*-Benzoguanine als mögliche Prodrug-Form für den erfolgreichen Transport durch Zellmembrane

In den Kokristallstrukturen TGT-**4.1**_{co}^{C2} und TGT-**4.2**_{co}^{C2} liegt das trizyklische Grundgerüst der Liganden und die umgebenen Aminosäuren der Bindetasche in den selben Konformationen vor, wie sie auch in der Kristallstruktur mit dem *lin*-Benzohypoxanthin **4.11** zu finden sind. Dort ist die katalytische Aminosäure Asp102 aus der Guanin-34/preQ₁-Bindetasche heraus rotiert und ermöglicht die Ausbildung eines Wassernetzwerks. In TGT-**4.1**_{co}^{C2} und TGT-**4.2**_{co}^{C2} werden zwei Wassermoleküle (**W**₁ und **W**₂) des Wassernetzwerks durch die Carbamatreste ersetzt. Zusätzlich können zwei H-Brücken zwischen der Carbamatgruppe und Ser103 aufgebaut werden, was im Vergleich zu dem *lin*-Benzohypoxanthin **4.11** mit einer um den Faktor 8 verbesserten Affinität einhergeht. Im Vergleich zu der eigentlichen Wirkform **4.10**, die eine ladungsgestützte Interaktion zu Asp102 ausbildet, reduziert sich die Affinität jedoch um den Faktor 13. Aufgrund des geringen Platzes in der Bindetasche, ist der Carbamatrest gezwungen eine vermutlich energetisch ungünstigere *syn*-Konformation einzunehmen. Die Carbamatgruppe und das trizyklische Grundgerüst liegen zusätzlich auch nicht koplanar, sondern um ca. 55° verdreht vor, um sterischen Repulsionen auszuweichen.

Ein Vergleich der Carbamat-substituierten *lin*-Benzoguanine **4.1/4.2** mit den alkylierten Verbindungen **4.8/4.9** legt nahe, dass die zwei zusätzlichen H-Brücken der Liganden zu Ser103 in TGT-**4.1**_{co}^{C2} bzw. TGT-**4.2**_{co}^{C2} wesentlich zur Bindungsaffinität beitragen. Der direkte Vergleich der Bindungsaffinitäten von **4.1/4.2** und **4.8/4.9** offenbart einen Unterschied von ca. Faktor 35 bzw. 50. Basierend auf den hier erhaltenen Erkenntnissen ist geplant, weitere Prodrug-Formen zu testen. Aufbauend könnten zellbasierte Aktivitätstests in Form eines *in vivo* Shigellen-Invasionsassays durchgeführt werden. Des Weiteren könnte an der Derivatisierung des Substituenten an Kohlenstoff C(6) des *lin*-Benzoguanins gearbeitet werden, da der Carbamat-Substituent aus einer anderen Richtung als bisher, an Kohlenstoff C(4), die Ribose-34-Tasche adressiert.

5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ₁-Bindetasche

5.1 Vorwort

Alle in diesem Kapitel neu präsentierte Liganden (**5.1 – 5.8**) wurden in Kooperation mit Dr. Christoph Hohn entwickelt. Dr. Christoph Hohn und Adrian Härtsch waren für die Synthese der Liganden zuständig (Arbeitsgruppe Prof. Dr. François Diederich, ETH Zürich, Schweiz). Die pK_a -Werte wurden von Severin Wendelspiess ermittelt (F. Hoffmann-La Roche AG, Schweiz). Die MD-Simulation der apo-TGT wurde bereits 2007 von Dr. Naomi Tidten berechnet. Die Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT, kinetische Radioaktivmessungen und röntgenkristallographische Untersuchungen wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt.

5.2 Einleitung

In diesem Kapitel wird eine neue Benzimidazol-basierte Ligandenserie vorgestellt. Das Design dieser Serie war nicht im Hinblick auf eine Bindungsaffinitätssteigerung gegenüber der *Z. mobilis* TGT entwickelt worden. Vielmehr lag der Fokus auf der Untersuchung der essentiellen Aminosäuren in der Substraterkennungsstelle, der Guanin/preQ₁-Bindetasche, und auf dem Vergleich zu etablierten Inhibitorgrundstrukturen. Zu diesen Grundstrukturen zählt unter anderem das *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst (**5.11**), das seit 2007 für das Enzym tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) etabliert ist^[12]. Es leitet sich von der Nukleinbase Guanin ab (**Abbildung 5.1**). Zwischen dem Imidazol- und dem Aminopyrimidinring ist ein Benzolring eingefügt. Zusätzlich ist an C(2) eine Aminomethylgruppe angebracht und ermöglicht so eine weitere Wasserstoffbrücke (H-Brücke) zu der Rückgrat-Carbonylgruppe von Ala232. Das so erhaltene Grundgerüst inhibiert das TGT-Enzym mit einer Affinität von 58 ± 36 nM (K_i)^[12]. Bei dem *lin*-Benzohypoxanthin-Grundgerüst (**5.9**) hingegen, was zeitlich etwas später untersucht wurde, fehlt die exozyklische Aminogruppe an C(6) und somit die Möglichkeit H-Brücken zu Asp102 aufzubauen^[114]. Zwar bildet sich ein wohl definiertes Wassernetzwerk an der freien Stelle (**Abbildung 5.3**), trotzdem war dieser Wegfall der Aminogruppe verbunden mit einer um den Faktor 112 verringerten Affinität ($K_i = 6.5 \pm 2.9$ μ M)^[114]. Dieser Einfluss einer exozyklischen Aminogruppe ist enorm. In vorangegangenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass diese Aminogruppe essentiell für die Interaktion mit der katalytisch aktiven Aminosäure Asp102 ist^[16, 17, 114]. Dieses Aspartat gehört zu vier Aminosäuren, die in der Guanin/preQ₁-Bindetasche positioniert sind, und die Substraterkennungsstelle bilden (Asp102, Asp156, Gln203 und Gly230). Sie bilden H-Brücken zu den natürlichen Substraten Guanin-34 der tRNA und preQ₁ und sind somit Teil der Erkennung der Aminopyrimidingruppierung in den genannten Substratmolekülen. Des Weiteren interagieren sie mit einer Vielzahl von untersuchten Inhibitoren der TGT (**Abbildung 5.1**).

5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ1-Bindetasche

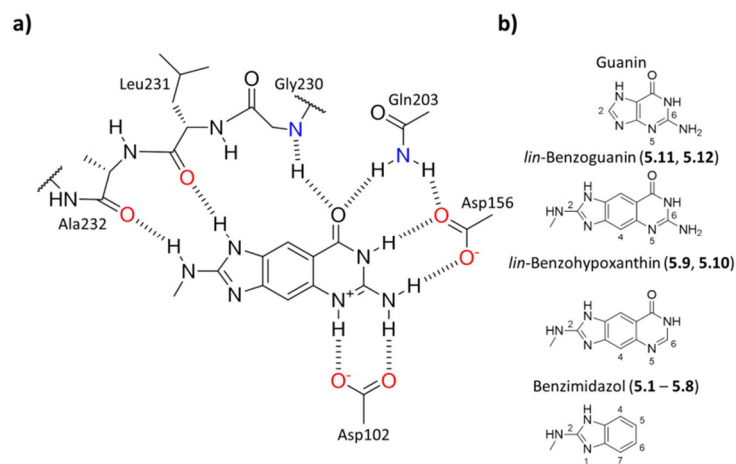


Abbildung 5.1. a) Bindungsmodus des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts (5.11). Tyr106 und Met260 sind zur besseren Übersicht weggelassen. b) Strukturen von Guanin und in diesem Kapitel einbezogene Grundgerüste.

Das Ziel der neu entworfenen Ligandenserie war es, die Einflüsse der Aminosäuren Asp156, Gln203 und Gly230 in der Bindetasche auf die Bindungsaffinität und den Bindungsmodus der zu untersuchenden Liganden aufzuklären. Dafür sollten die neuen Liganden weiterhin die polaren Interaktionen mit Ala232 und Leu231 aufrechterhalten und zwischen Met260 und Tyr106 interkalieren. Als Leitstruktur wurde das Benzimidazol-Grundgerüst gewählt, aus dem die bekannten *lin*-Benzopurine (*lin*-Benzohypoxanthine 5.9, 5.10 und *lin*-Benzoguanine 5.11, 5.12) zum Teil auch bestehen. Die Aminopyrimidingruppierung wurde fragmentiert, um den Einfluss von Asp156 zu untersuchen. Die Derivatisierung wurde am C(5) (Tabelle 5.1) mit primären Amiden (5.1 und 5.2), sekundären Amiden (5.3 und 5.4) und Hydraziden (5.5 und 5.6) durchgeführt. Die Erweiterung des primären Amids der Liganden 5.1 und 5.2 zu einem Hydrazid-substituierten Benzimidazol (5.5 und 5.6) kann prinzipiell zu Ausbildung einer weiteren H-Brücke zu Asp156 führen. Bei den Liganden 5.3 und 5.4 wurde der Methylamid-Substituent gewählt, um das mögliche Ausbilden einer weiteren H-Brücke zu Asp156 zu verhindern. So würden sich die primären Amide (5.1 und 5.2) und Hydrazide (5.5 und 5.6) besser mit den sekundären Amiden (5.3 und 5.4) vergleichen lassen. Zusätzlich zu den oben genannten Liganden wurde auch der Einfluss von Guanidin-substituierten Liganden untersucht (5.7 und 5.8), mit der Absicht die Interaktion mit Asp156 und Asp102 aufrechtzuerhalten. Durch das Aufschneiden des Aminopyrimidinrings der *lin*-Benzoguanin-Grundstruktur (5.11) entfällt die Carbonylfunktion, die als H-Brückenakzeptor zu dem Rückgrat von Gly230 und der Seitenkette von Gln203 dient. Auf diesem Weg sollte der Beitrag zur Bindungsaffinität der H-Brücken zu den genannten Resten untersucht werden. Der Methylaminorest an (C2) wurde ebenfalls noch durch einen Morpholinoethylaminorest ersetzt, um den möglichen Einfluss auf die Affinität durch Wechselwirkungen in der Uracil-33-Tasche festzustellen. Dies ermöglicht auch den Vergleich mit den analogen *lin*-Benzopurinen, die den entsprechenden Substituenten tragen.

5.3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 5.1. Chemische Formel, Bindungsaffinitäten und pK_a-Werte.

Ligand	Struktur		K_i [μM]	pK_a		
	Grundgerüst	R				
Benzimidazole						
5.1			300 ± 37	6.4 (N(1)H ⁺)	11.7 (C(O)NH)	---
5.2			544 ± 43	6.6 (N(1)H ⁺)	11.5 (C(O)NH)	---
5.3			270 ± 50	6.4 (N(1)H ⁺)	11.8 (C(O)NH)	---
5.4			264 ± 40	6.6 (N(1)H ⁺)	11.6 (C(O)NH)	---
5.5			283 ± 40	6.4 (N(1)H ⁺)	11.8 (C(O)NH)	2.9 NHNH ₂
5.6			282 ± 18	6.6 (N(1)H ⁺)	11.5 (C(O)NH)	2.8 NHNH ₂
5.7			19 ± 2	6.7 (N(3)H ⁺)	---	12.4 NH ₂ ⁺ NH ₂
5.8			58 ± 2	6.6 (N(3)H ⁺)	---	>12 NH ₂ ⁺ NH ₂
lin-Benzohypoxanthine						
5.9			$6.5 \pm 2.9^{[114]}$	5.6 ^[114] (N(3)H ⁺)	>10 ^[114] (N(7)H ⁺)	1.8 ^[114] (N(5)H ⁺)
5.10			4.1 ^[114]	n.b.	n.b.	---
lin-Benzoguanine						
5.11			$0.058 \pm 0.036^{[12]}$	5.7 ^[114] (N(3)H ⁺)	>10 ^[114] (N(7)H ⁺)	4.4 ^[114] (N(5)H ⁺)
5.12			$0.006 \pm 0.006^{[12]}$	n.b.	n.b.	---

n.b. nicht bestimmt.

5.3.1 Kokristallstrukturen und Charakterisierung der Benzimidazol-basierten Inhibitoren

Für die Benzimidazol Derivate **5.1** und **5.2**, als auch **5.5** bis **5.8**, konnten Kokristallstrukturen der Raumgruppe C2 mit einer Auflösung zwischen 1.21 Å und 1.70 Å erhalten werden (TGT-**5.1**, **5.2**_{co}^{C2} und TGT-**5.5** - **5.8**_{co}^{C2}). Dies ermöglicht eine detaillierte Analyse der Bindungsmodi der Liganden und deren Einfluss auf die umliegenden Aminosäuren der Bindetasche. Von den Liganden **5.3** und **5.4** konnten keine Kokristallstrukturen mit einer interpretierbaren Differenzelektronendichte für die Liganden erhalten werden.

Sowohl die Erhöhung der Ligandkonzentration auf das Vierfache (von 1.6 mM auf 6.4 mM), als auch das Eindiffundieren der Liganden in vorher gezüchtete und nicht komplexierte TGT-Kristalle (*Soaking*), führte zu keiner eindeutigen Differenzelektronendichte der Liganden in gebundenem Zustand.

Für den Morpholinoethylamin-Substituenten an C(2) des Benzimidazol-Grundgerüsts der Liganden **5.2**, **5.6** und **5.8** ließ sich keine eindeutig definierte Differenzelektronendichte bestimmen. Dies spricht für eine starke Unordnung der Substituenten über mehrere teilbesetzte räumliche Konfigurationen. Während bei den Liganden **5.1**, **5.5** und **5.7** sowie bei dem Morpholinoethylamin-substituierten Ligand **5.2** das Grundgerüst zu 100% besetzt in der Struktur gefunden wurde, liegen bei den Morpholinoethylamin-substituierten Liganden **5.6** das Grundgerüst nur zu 73% und bei Ligand **5.8** zu 85% populierte in der Kristallstruktur vor. Dies kann auf die geringe Affinität und Löslichkeit der Liganden zurückgeführt werden. Während man bei den *lin*-Benzohypoxanthinen (**5.9** und **5.10**) und den *lin*-Benzoguaninen (**5.11** und **5.12**) einen Affinitätsgewinn um den Faktor 1.6 bzw. 9.7 beobachten konnte, wenn der Methylaminorest an C(2) durch einen Morpholinoethylaminrest ausgetauscht wird, ist eine vergleichbare Affinitätssteigerung erstaunlicherweise bei den Benzimidazol-basierten Liganden nicht erkennbar. Bei den Guanidin-substituierten Liganden ist sogar ein Affinitätsverlust um den Faktor 3 feststellbar.

Detaillierte Informationen zu den Kokristallstrukturen TGT·**5.1**_{co}^{C2} bis TGT·**5.8**_{co}^{C2} sind in **Tabelle 12.2** aufgelistet. Details zu der Bestimmung der Bindungsaffinitäten und zu den röntgenkristallographischen Untersuchungen finden sich im **Kapitel 11**.

5.3.1.1 Kokristallstrukturen mit Ligand **5.1** und **5.2**

Wie in vorhergehenden Arbeiten beschrieben^[12, 14, 115] bildet die bityklische Benzimidazol-Kernstruktur die zu erwartenden H-Brücken zu den Rückgratatomen der Aminosäuren Ala232, Leu231 und Gly230 aus (**Abbildung 5.2**). Die Seitenkette von Gln203 agiert als H-Brückendonator zu den Carbonylgruppen der Liganden. Das bityklische Grundgerüst bildet weiterhin Kontakte in Form einer π -stacking Interaktion mit den benachbarten Aminosäuren Tyr106 und Met260 aus.

Die Seitenkette der katalytischen Aminosäure Asp102 nimmt entgegen den Erwartungen in beiden Kokristallstrukturen zwei unterschiedliche Konformationen ein. Konformation B (Besetzung: 47% in TGT·**5.1**_{co}^{C2}; 51% in TGT·**5.2**_{co}^{C2}) nimmt eine von dem Liganden wegrotierte Geometrie ein, die der Struktur des apo-TGT Enzyms (PDB ID: 1POD^[86]) entspricht. Diese Geometrie ist auch in den Strukturen der *lin*-Benzohypoxanthine zu finden (**Abbildung 5.3**).

5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ1-Bindetasche

Konformation A (Besetzung: 53% in TGT-**5.1**_{CO}^{C2}; 49% in TGT-**5.2**_{CO}^{C2}) geht hingegen eine Orientierung ein, wie sie auch in den Kristallstrukturen der *lin*-Benzoguanine zu finden ist (u.a. TGT-**5.11**_{SOAK}^{C2}, PDB ID: 4PUK und TGT-**5.12**_{SOAK}^{C2}, PDB ID: 4PUJ^[118]). In TGT-**5.1**_{CO}^{C2} und TGT-**5.2**_{CO}^{C2} interagiert die Carboxylatfunktion in dieser Konformation über das Wassermolekül **W**₁ mit der primären Amidfunktion der Liganden (Distanzen zwischen 2.9 und 3.0 Å). Der zweite Sauerstoff der Carboxylatfunktion von Asp102 wird in beiden Fällen durch weitere Wassermoleküle aus der Ribose-34-Tasche (2.9 – 3.1 Å) solvatisiert. Die Carboxylatfunktion von Asp156 bildet eine H-Brücke zu dem Stickstoffatom der Amidfunktionen des Liganden **5.1** bzw. **5.2** aus (2.9 – 3.0 Å). Das Wassermolekül **W**₁, das die Interaktion in der Konformation A der Seitenkette von Asp102 zum Liganden **5.1** bzw. **5.2** ermöglicht, solvatisiert zusätzlich den zweiten Sauerstoff der Carboxylatfunktion von Asp156 (3.1 Å).

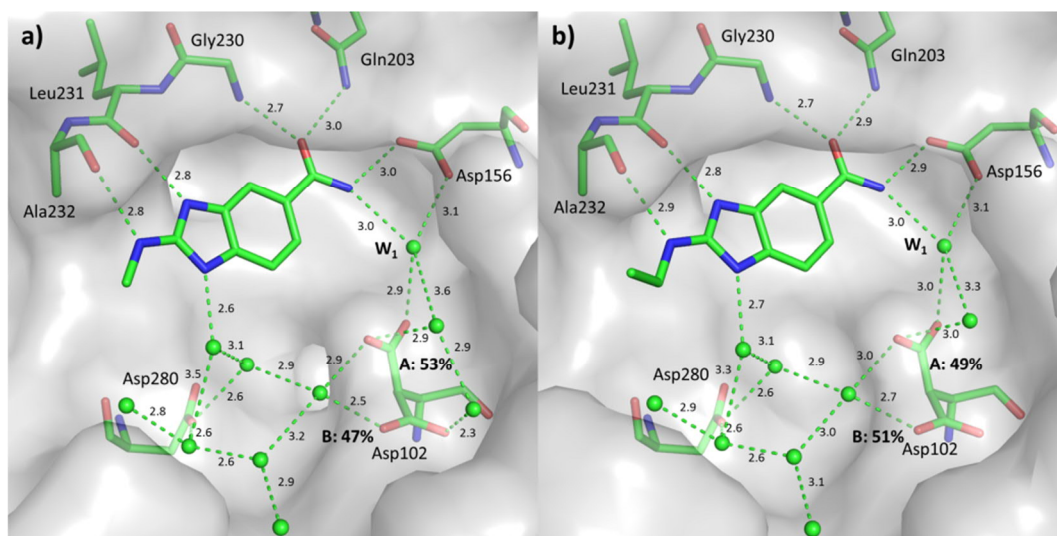


Abbildung 5.2. Guanin-34/preQ₁-Bindetasche von **a)** TGT-**5.1**_{CO}^{C2} (PDB ID: 5J9M) und **b)** TGT-**5.2**_{CO}^{C2} (PDB ID: 5JT5). Farbcode: Kohlenstoff grün, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken sind als grüne gestrichelte Linien dargestellt und Distanzen in Ångström (Å) angegeben. Tyr106 und Met260 sind zur besseren Übersicht weggelassen. Wassermoleküle sind als grüne Kugeln dargestellt. Besetzungen der alternativen Konformationen von Asp102 sind als schwarze Werte angegeben.

Die Affinitäten der primären Amide (**5.1** ($K_i = 300 \pm 37 \mu\text{M}$) und **5.2** ($K_i = 544 \pm 43 \mu\text{M}$)) fallen im Vergleich zu den analogen *lin*-Benzohypoxanthinen (**5.9** ($K_i = 6.5 \pm 2.9 \mu\text{M}$) und **5.10** ($K_i = 4.1 \mu\text{M}$)) um ca. den Faktor 46 bzw. 132 stark ab. In den Kristallstrukturen der *lin*-Benzohypoxanthine bildet sich zwischen dem Liganden und Asp102 ein wohldefiniertes Wassernetzwerk aus (**Abbildung 5.3**)^[114]. Drei Wassermoleküle (**W**₂, **W**₃ und **W**₄) bilden in Form eines Dreiecks den Grundbaustein dieses Wassernetzwerks. Der Stickstoff N(5) der *lin*-Benzohypoxanthine stabilisiert das Wassermolekül **W**₄ an dieser Stelle des aktiven Zentrums.

In den Kokristallstrukturen der Liganden **5.1** und **5.2** kann sich dieses Wassernetzwerk allerdings nicht ausbilden, da dies die Konformation A der flexiblen Seitenkette von Asp102 verhindert. Zwei der drei Wassermoleküle (**W₂** und **W₄**) werden durch die Carboxylatfunktion in der alternativen Konformation verdrängt. Dies verhindert die Ausbildung eines intakten Wassernetzwerks. Die damit verbundene verringerte Solvatisierung von Asp156 kann der Grund für den dramatischen Affinitätsverlust der Liganden **5.1** und **5.2** im Vergleich zu **5.9** und **5.10** sein. Diese Beobachtung unterstützt die bereits durch uns aufgestellte Hypothese, dass optimale, zweizählige Wechselwirkungen sowohl mit Asp156, als auch Asp102, sehr wichtig für die Erkennung und für die affine Bindung der natürlichen Substrate bzw. potenter Inhibitoren sind^[118].

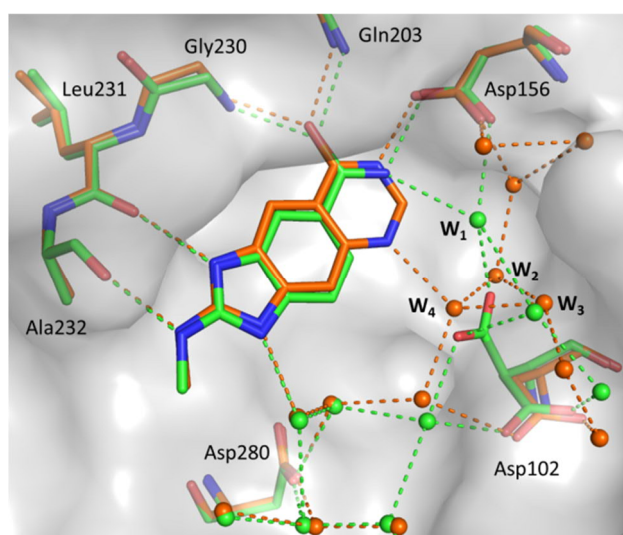


Abbildung 5.3. Überlagerung von TGT-**5.9**_{CO^{C2}} (PDB ID: 3S1G^[114]; Farbcode: Kohlenstoff und Wassermoleküle orange) und TGT-**5.1**_{CO^{C2}} (PDB ID: 5J9M; Farbcode: Kohlenstoff und Wassermoleküle grün, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau). Sauerstoff rot, Stickstoff blau. H-Brücken (Distanzen zwischen 2.5 und 3.5 Å) sind nach dem jeweiligen Komplex als farbige gestrichelte Linien dargestellt. Wassermoleküle sind als Kugeln angezeigt.

5.3.1.2 Kokristallstrukturen mit Ligand **5.3** und **5.4**

Von den Liganden **5.3** ($K_i = 270 \pm 50 \mu\text{M}$) und **5.4** ($K_i = 264 \pm 40 \mu\text{M}$) konnten trotz Austesten von alternativen Kristallisationsprotokollen keine Strukturen mit ausreichender bzw. interpretierbarer Differenzelektronendichte zum Erkennen der gebundenen Liganden in der Bindetasche erhalten werden. Eine Möglichkeit der Erklärung für die nicht nachweisbare Differenzelektronendichte ist, dass die Liganden ähnlich wie der flexible C(2)-Morpholinoethylamin-Substituent des Grundgerüsts stark ungeordnet über mehrere teilbesetzte räumliche Orientierungen binden. Verglichen mit den unsubstituierten Derivaten **5.1** und **5.2** sind **5.3** und **5.4** sogar leicht potenter.

Somit ist ein Vergleich der Bindungsaffinitäten innerhalb der Amid-basierten Benzimidazole wegen der fehlenden strukturellen Information nicht möglich. Allerdings suggerieren die geringen Unterschiede zwischen den Serien **5.1/5.2**, **5.3/5.4** bzw. **5.5/5.6** bei den Affinitäten, dass die zusätzliche Methylgruppe im Vergleich zu den Liganden **5.1** und **5.2** bzw. der Austausch der Methylgruppe durch eine Aminogruppe bei den Liganden **5.5** und **5.6** keinen massiven Einfluss auf das Bindungsverhalten hat.

5.3.1.3 Kokristallstrukturen mit Ligand 5.5 und 5.6

Das Benzimidazol-Kerngerüst der primären Amide und Hydrazide bilden dasselbe Interaktionsmuster mit dem Protein aus (**Abbildung 5.4**). Allerdings kann nur in TGT·**5.5**_{co}^{C2} eine schwache H-Brücke zwischen dem Stickstoff N(1) des Imidazolrings und einem Wassermolekül der Ribose-34-Tasche festgestellt werden (3.5 Å). In den Kokristallstrukturen der Hydrazid-basierten Benzimidazole ragt der terminale Stickstoff des Hydrazids direkt auf den Carbonsäure-Kohlenstoff der Seitenkette von Asp156 und bildet dort zwei H-Brücken zu den Sauerstoffen aus (2.3 – 2.9 Å). Der Hydrazidrest, welcher in *trans*-Konformation vorliegt (179° in TGT·**5.5**_{co}^{C2} und TGT·**5.6**_{co}^{C2}), führt dazu, dass Asp156 um ca. 0.9 Å (Cα...Cα) in TGT·**5.5**_{co}^{C2} und um ca. 0.6 Å (Cα...Cα) in TGT·**5.6**_{co}^{C2} im Vergleich zu den analogen primären Amiden (**5.1** und **5.2**) aus der Bindetasche gedrängt wird. Interessanterweise konnte die Orientierung der Carboxylatfunktion von Asp102 in beiden Kokristallstrukturen mit einer zu 100% populierten Konformation in Richtung des Liganden verfeinert werden. Dort kann der Sauerstoff allerdings nicht wie bei den Liganden **5.1** und **5.2** eine Wasser-vermittelte Interaktion zu den Liganden aufbauen. Es konnte in den Kokristallstrukturen keine ausreichende Differenzelektronendichte für ein Wassermolekül entdeckt werden. Nur die Interaktionen zu den Wassermolekülen in der Ribose-34-Tasche können erneut detektiert werden (2.7 – 3.2 Å).

5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ1-Bindetasche

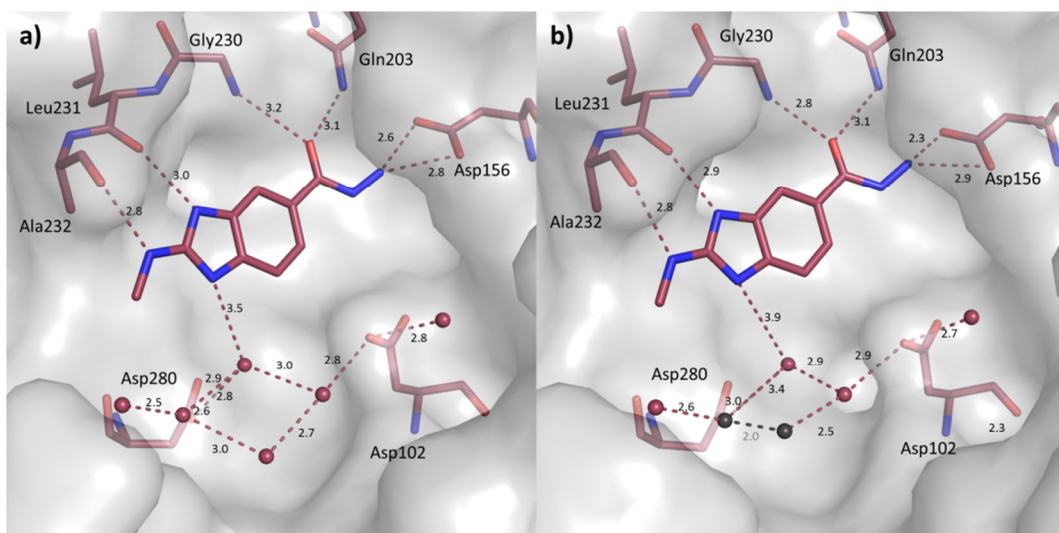


Abbildung 5.4. Guanin-34/preQ₁-Bindetasche von **a)** TGT-5.5_{co}^{C2} (PDB ID: 5J9N) und **b)** TGT-5.6_{co}^{C2} (PDB ID: 5JT6). Farbcode: Kohlenstoff weinrot, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken sind als weinrote gestrichelte Linien dargestellt und Distanzen in Ångström (Å) angegeben. Wassermoleküle sind als weinrote Kugeln dargestellt. Tyr106 und Met260 sind zur besseren Übersicht weggelassen. Alternative Wasser-Konformationen sind als graue Kugeln dargestellt; Angabe der Distanz ist grau gefärbt.

Legt man die pK_a -Werte der Liganden in Wasser zu Grunde, sollte der ungeladene Hydrazid-Teil nicht in der Lage sein die negative Ladung der Carboxylatgruppe von Asp156 zu kompensieren. Dies erklärt auch die vergleichbaren Affinitäten der Liganden **5.1/5.2** und **5.5/5.6**. Zusätzlich verhindert die Seitenkette von Asp102, ähnlich wie bei den Liganden **5.1/5.2**, das Ausbilden eines Wassernetzwerks, wie es bei den *lin*-Benzohypoxanthinen zu finden ist^[114]. Das oben genannte Zurückdrängen der Seitenkette von Asp156 ist mit einer Reorganisation weiterer benachbarter Aminosäuren verbunden und führt sogar zu einer Veränderung der Sekundärstruktur des *Loops* zwischen den Aminosäuren Glu157 und Thr161 (**Abbildung 5.5**).

Diese strukturelle Umlagerung ist sowohl mit der Unterbrechung und Neubildung von mehreren Interaktionen, als auch mit der Neuordnung von Wassermolekülen, verbunden. Dieses Zusammenspiel mehrerer Änderungen macht es schwer, die Hydrazid-basierten Liganden mit den bereits charakterisierten Inhibitoren direkt zu vergleichen. Erstaunlich an diesen strukturellen Änderungen ist allerdings, dass im Vergleich zu den primären (**5.1**, **5.2**), als auch sekundären Amiden (**5.3**, **5.4**), die Liganden **5.5** ($K_i = 283 \pm 40 \mu\text{M}$) und **5.6** ($K_i = 282 \pm 18 \mu\text{M}$) nicht an Affinität einbüßen. Dies lässt darauf schließen, dass die eingegangenen strukturellen Änderungen entweder energetisch kostenneutral sind oder eine mit der Proteinfunktion verknüpfte Konformation darstellen, die die gebundenen Liganden im Protein stabilisieren.

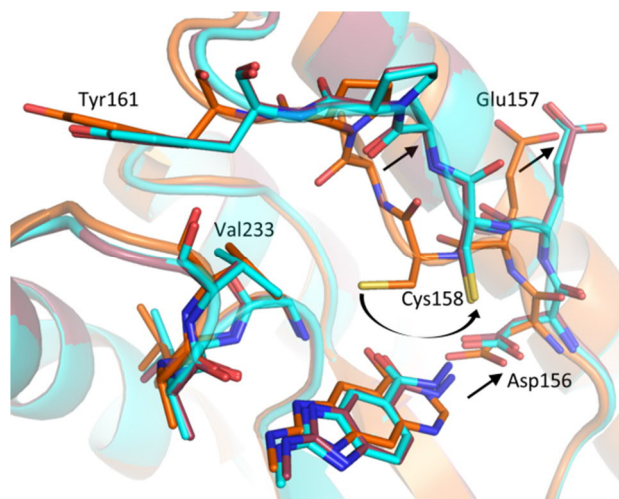


Abbildung 5.5. Überlagerung von TGT·5.9_{CO}^{C2} (PDB ID: 3S1G^[114]; Farbcode: Kohlenstoff orange), TGT·5.5_{CO}^{C2} (PDB ID: 5J9N; Farbcode: Kohlenstoff weinrot) und TGT·5.6_{CO}^{C2} (PDB ID: 5JT6; Farbcode: Kohlenstoff cyan). Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb. Proteinbewegungen sind als schwarze Pfeile dargestellt.

3.3.1.4 Kokristallstrukturen mit Ligand 5.7 und 5.8

Im Vergleich zu den *lin*-Benzopurinen (5.9 – 5.12), als auch zu den oben beschriebenen Benzimidazol-basierten Liganden (5.1 – 5.6), fehlen den Inhibitoren 5.7 und 5.8 die interne Carbonylfunktion und demnach die Möglichkeit direkte Interaktionen mit Gly230 und Gln203 aufzubauen. Wie die entsprechenden Kristallstrukturen zeigen (**Abbildung 5.6**), werden diese Aminosäuren nun von einem überbrückenden Wassermolekül (**W₁**) untereinander solvatisiert und stabilisiert (3.3 – 3.5 Å). Die Carboxylatfunktionen der Seitenketten von Asp102 und Asp156 nehmen jeweils die zu erwartende und mit der Bindung der *lin*-Benzoguanine (5.11 und 5.12) analoge Orientierung ein. Aufgrund des geladenen Guanidins der Liganden ($pK_a > 12$) werden ladungsgestützte H-Brücken zu beiden Aspartaten ausgebildet. Der 2-Aminoimidazolring interagiert unter Ausbildung von H-Brücken mit den Carbonylgruppen von Ala232 und Leu231 (2.9 Å) in beiden Strukturen.

Der Verlust der H-Brücken zu Gly230 und Gln203 führt im Vergleich zu den *lin*-Benzoguaninen zu einem ähnlichen Affinitätsverlust, wie dies beim Wegfall der Interaktion zu Asp102 bei den *lin*-Benzohypoxanthinen zu beobachten ist. Mit $K_i = 19 \pm 2 \mu\text{M}$ (5.7) und $K_i = 58 \pm 2 \mu\text{M}$ (5.8) binden die Guanidin-substituierten Liganden zwar etwas stärker an das Protein als die anderen Benzimidazol-basierten Liganden, die ladungsgestützten Interaktionen zu Asp102 und Asp156 können aber offensichtlich den Verlust der Wechselwirkungen zu den Stickstoffatomen von Gly230 und Gln203 nicht kompensieren. Interessanterweise kann, analog wie bei den Hydrazid-substituierten Benzimidazolen, auch bei den Guanidin-substituierten Liganden die strukturelle Abwandlung des genannten sekundären Strukturelements festgestellt werden (**Abbildung 5.7**).

5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ1-Bindetasche

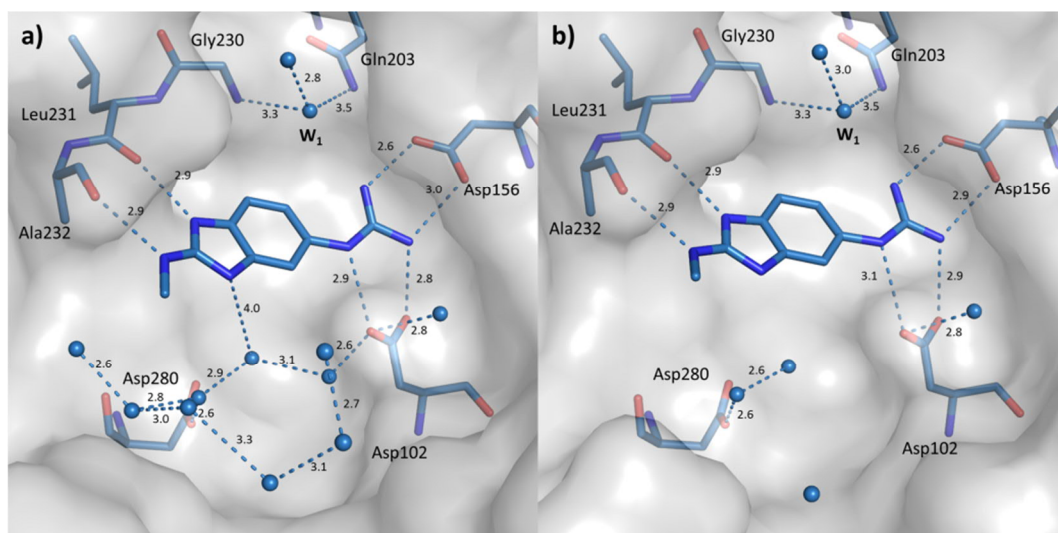


Abbildung 5.6. Guanin-34/preQ₁-Bindetasche von **a)** TGT-5.7_{co}^{C2} (PDB ID: 5J90) und **b)** (TGT-5.8_{co}^{C2}; PDB ID: 5JT7). Farbcode: Kohlenstoff hellblau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken sind als hellblau gestrichelte Linien dargestellt und Distanzen in Ångström (Å) angegeben. Wassermoleküle sind als hellblaue Kugeln dargestellt. Tyr106 und Met260 sind zur besseren Übersicht weggelassen.

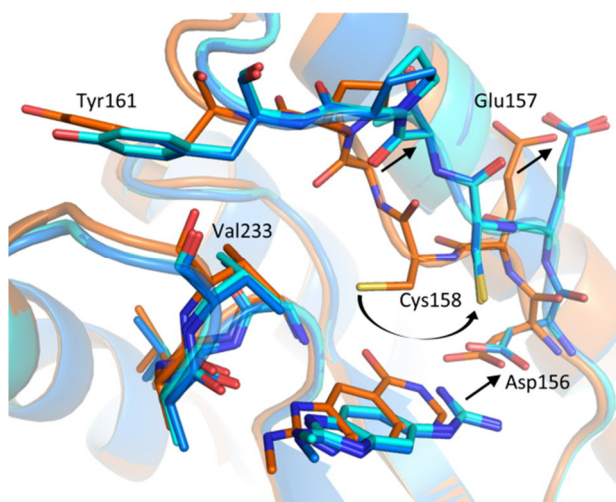


Abbildung 5.7. Überlagerung von TGT-5.9_{co}^{C2} (PDB ID: 3S1G^[114]; Farbcode: Kohlenstoff orange), TGT-5.8_{co}^{C2} (PDB ID: 5J90; Farbcode: Kohlenstoff hellblau) und TGT-5.8_{co}^{C2} (PDB ID: 5JT7; Farbcode: Kohlenstoff cyan). Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb. Proteinbewegungen sind als schwarze Pfeile dargestellt.

Bei den zuletzt genannten Verbindungen ist allerdings das räumliche Zurückdrängen der Aminosäure Asp156 weniger ausgeprägt (Abstand der Positionen von Asp156 in TGT-5.1_{co}^{C2} und TGT-5.7_{co}^{C2}, als auch TGT-5.2_{co}^{C2} und TGT-5.8_{co}^{C2}: $\alpha\alpha\cdots\alpha\alpha = 0,4 \text{ Å}$). Das oben genannte Wassermolekül (**W**₁), welches in der Nähe der ursprünglichen Position der Carbonylfunktion bindet, ist notwendig, um die Aminosäuren Gly230 und Gln203 zu solvatisieren, den entstandenen Hohlraum zu füllen und sterischen Druck auf den beweglichen Loop im Bereich Glu157 bis Thr161 auszuüben (**Abbildung 5.7**). Demnach unterstützt das Wassermolekül **W**₁ die Erweiterung der Tasche.

Bei **5.7** und **5.8** ist im Vergleich zu den anderen Benzimidazolen, als auch zu den *lin*-Benzopurinen, das Grundgerüst etwas abgewinkelt (**Abbildung 5.8**). Dies kann gegebenenfalls auch mit der Position des Wassermoleküls **W₁** zusammenhängen, das sonst dem Guanidinrest zu nahe kommen würde.

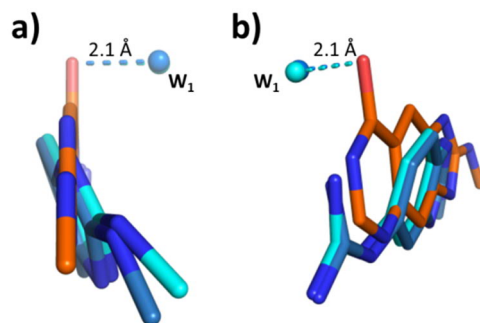


Abbildung 5.8. Überlagerung von TGT·**5.9**_{co}^{C2} (PDB ID: 3S1G^[114]; Farbcode: orange), TGT·**5.7**_{co}^{C2} (PDB ID: 5J9O; Farbcode: hellblau) und TGT·**5.8**_{co}^{C2} (PDB ID: 5JT7; Farbcode: cyan). Sauerstoff rot, Stickstoff blau. **a)**“Rückansicht“, **b)**“Seitenansicht“. Abstand zwischen der Carbonylfunktion von **5.9** und dem Wasser **W₁** als gestrichelte Linie in der Farbe des jeweiligen Komplexes. Angaben der Distanz in Ångström (Å). Wassermolekül **W₁** ist als Kugel in der Farbe des jeweiligen Komplexes dargestellt.

5.3.2 Erweiterung der Guanin/preQ₁-Bindetasche bestätigt durch eine MD-Simulation

In Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT wurden in mehreren Publikationen die enorme Anpassungsfähigkeit und Flexibilität des Proteins festgestellt. Nach den bisherigen Erkenntnissen waren die Bereiche allerdings in der Regel auf die Ribose-34-Tasche beschränkt, bei der der flexible β 1 α 1-Loop durch verschieden substituierte Liganden verdrängt und so die Assoziation des Homodimers gestört werden konnte (**Kapitel 3 & 7**)^[15, 27, 137]. Bei den vorliegenden Benzimidazol-basierten Liganden wurden nun größere strukturelle Änderungen der Guanin/preQ₁-Bindetasche festgestellt.

Vor der eigentlichen Aufnahme von Liganden in die Proteinbindetasche kann das Protein in einem oder in mehreren energetisch niedrigen Konformationszuständen vorliegen. Durch die Bindung eines geeigneten Liganden wird einer dieser Konformationszustände stabilisiert oder ein neuer energetisch günstiger Zustand erreicht, welcher vorteilhaft für die Bindung des Liganden ist. Ein von Grünberg *et al.* (2004)^[166] entwickeltes Modell teilt die Bindung eines Liganden an ein Rezeptorprotein in drei Schritte ein: Diffusion, Konformerauswahl und induzierte Anpassung. Mit den Jahren wurde die Beschreibung der Ligand- und Rezeptorflexibilität zunehmend in die Betrachtungen des strukturbasierten Wirkstoffdesigns integriert und weiter verbessert^[167].

Die Ligandenflexibilität kann durch statistische wie auch systematische Vergleiche von Molekülstrukturen in Struktur-Datenbanken (z.B. CSD-Datenbank) abgeschätzt werden. Die Größe des Rezeptors bzw. des Proteins macht die Vorhersage jedoch anspruchsvoller. Dies kann allerdings durch rechenintensive computergestützte Methoden simuliert werden. Allgemein kann die Flexibilität von Proteinen von kleinen lokalen Schwingungen und Drehungen, z.B. von Seitenketten, bis hin zu großen Bewegungen und Reorientierungen von Sekundär- bis hin zu Quartärstrukturelementen reichen (**Kapitel 3 & 7**)^[168]. Eine Möglichkeit, die Flexibilität von Proteinen vorherzusagen und zu simulieren, ist der Einsatz von Molekulardynamik-Simulationen (MD-Simulationen) auf dem Computer^[169, 170].

Es gibt zahlreiche Beispiele im Bereich der Arzneistoffentwicklung, bei denen der Fokus auf Proteinflexibilität gelegt wurde^[171-173]. Als Beispiel ist eine Studie von 2004 zu nennen, die zeigte, dass ein Hohlraum benachbart zum aktiven Zentrum der HIV-Integrase möglicherweise durch Liganden zu adressieren wäre. Dieser Hohlraum wurde durch MD-Simulationen vorhergesagt^[171]. Die Identifizierung von neuen Bindetaschen erhöht die Chance Liganden mit ausreichender Diversität und Selektivität zu entwickeln, was im Falle der HIV-Integrase dazu führte, dass nach ersten klinischen Tests mit Raltegravir (Isentress® MSD Sharp & Dohme) der erste HIV-Integrase-Inhibitor als Behandlungsalternative von HIV-infizierten Patienten auf den Markt kam^[174].

Auch im vorliegenden Fall der TGT, wurde die Taschenerweiterung der Guanin/preQ₁-Bindetasche bereits 2007 von Dr. Naomi Tidten mittels einer 5 ns langen MD-Simulation an der *Z. mobilis* TGT vorhergesagt^[175]. Die Taschenerweiterung im Verlauf der Trajektorie wurde anhand der Distanz zwischen den Atomen S_{Cys158} und C_{Val233} detektiert (**Abbildung 5.9**). Des Weiteren wurden Konformationen des Proteins zu drei Zeitpunkten entlang der Trajektorie der Simulation abgespeichert und für die intermediären Strukturen die Taschenvolumina berechnet (**Tabelle 5.2**)^[175-177]. Die berechneten Abstände in der MD-Simulation der Wild-Typ apo-TGT steigen von 6 Å auf 12 Å, was mit der Erweiterung des Bindetaschenvolumens von 250 Å³ auf bis zu 750 Å³ korreliert werden konnte (**Tabelle 5.2**).

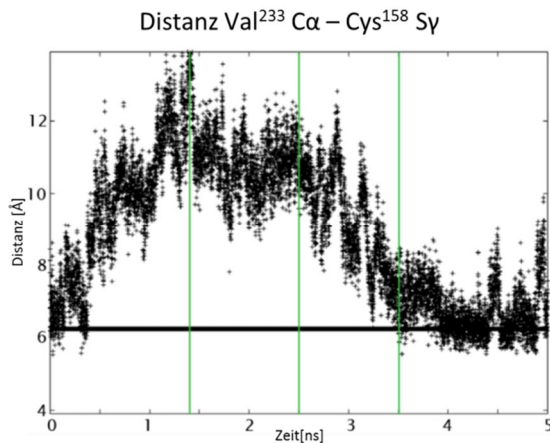


Abbildung 5.9. MD-Simulation der apo-TGT. Distanzen zwischen $C\alpha_{Val233}$ und Sy_{Cys158} . Grüne Linien zeigen Konformationen, die für die Berechnung der Bindetaschenvolumina verwendet wurden (**Tabelle 5.2**)^[175].

Tabelle 5.2. Volumen der Bindetaschen berechnet mit CASTp^[175-177].

TGT Spezies	Volumen [Å ³]
Wild-Typ apo-TGT in Komplex mit preQ ₁ (PDB ID: 1P0E ^[86])	250
TGT(Cys ¹⁵⁸ Val / Val ²³³ Gly / Tyr ¹⁰⁶ Phe) in Komplex mit Queuine (PDB ID: 3BLO ^[83])	650
Homologiemodell der humanen TGT (hTGT)	600
Wild-Typ apo-TGT (1.4 ns)	750
Wild-Typ apo-TGT (2.5 ns)	710
Wild-Typ apo-TGT (3.5 ns)	250

Interessanterweise verwies die MD-Simulation schon damals auf erhöhte Flexibilität in diesem Bereich des Proteins, die wir nun erstmals experimentell in Kokristallstrukturen der Liganden **5.5** - **5.8** nachweisen konnten. In TGT-**5.1**_{CO}^{C2} und TGT-**5.2**_{CO}^{C2} liegt ein Abstand zwischen Sy_{Cys158} und $C\alpha_{Val233}$ bei 6.4 Å bzw. 6.2 Å. Ähnliche Distanzen sind in der apo-TGT Struktur (6.5 Å) und in den Komplexen mit den *lin*-Benzopurinen (TGT-**5.9**_{CO}^{C2}: 6.5 Å; TGT-**5.11**_{SOAK}^{C2}: 6.2 Å) zu finden. Im Gegensatz dazu wurde in den Kokristallstrukturen mit den Hydrazid-basierten Liganden 10.2 Å (**5.5** und **5.6**) und mit den Guanidin-basierten Liganden 10.5 Å (**5.7**), als auch 10.6 Å (**5.8**), zwischen Sy_{Cys158} und $C\alpha_{Val233}$ festgestellt (**Abbildung 5.10**).

Im Hinblick auf die Ergebnisse der MD-Simulation legt dies nahe, dass die Guanidin- wie auch die Hydrazid-basierten Liganden eine Konformation des Proteins stabilisieren, die auch unter physiologischen Bedingungen am unkomplexierten Enzym ohne den Einfluss von Liganden auftreten kann. Dies kann auch der Grund dafür sein, dass die Bindungsaffinitäten dieser Liganden im Vergleich zu den Amid-basierten Benzimidazolen keine großen Unterschiede aufweisen.

Eine Analyse der bisher in der *protein data bank* (PDB, www.rcsb.org) deponierten *Z. mobilis* TGT Strukturen zeigt zusätzlich, dass, auch wenn der *Loop* zwischen Glu157 und Thr161 bisher strukturell hochkonserviert vorlag, die Seitenkette von Cys158 bereits in einigen wenigen Strukturen mit alternativen Konformationen der Seitenkette vorkam und deshalb als der Auslöser für die transiente Taschenerweiterung gesehen werden kann. Es handelt sich bei den Strukturen jedoch überwiegend um in der Guanin/preQ₁-Bindetasche mutierte Varianten der TGT. Die gemessenen Abstände zwischen Sy_{Cys158} und $C\alpha_{Val233}$ fallen hier in den Bereich von 6.6 Å bis 9.8 Å.

5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ1-Bindetasche

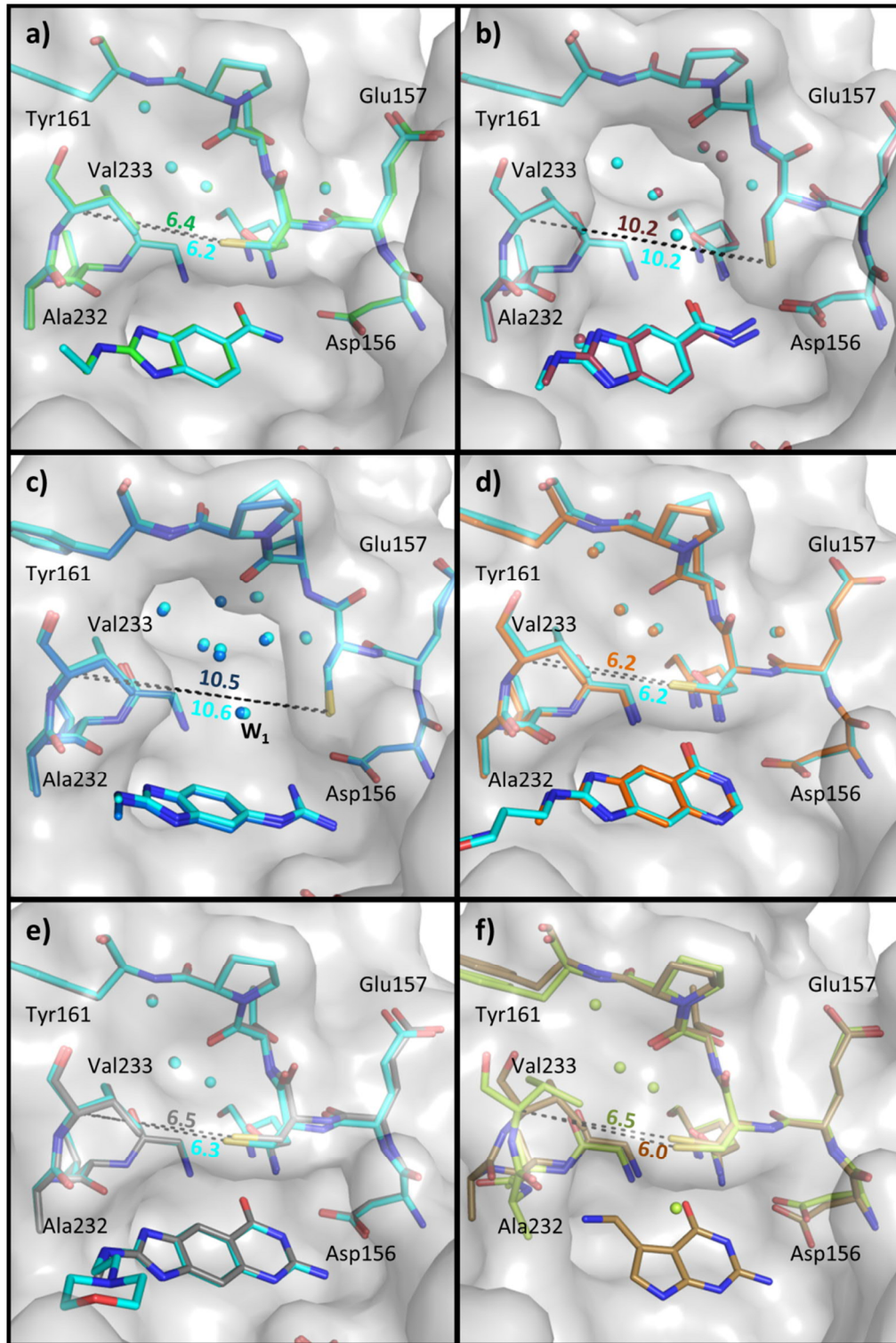


Abbildung 5.10. Distanzen zwischen $C\alpha_{Val233}$ und $S\gamma_{Cys158}$ in den Kristallstrukturen. **a)** TGT-5.1_{CO}^{C2} (PDB ID: 5J9M; grün) und TGT-5.2_{CO}^{C2} (PDB ID: 5JT5; cyan), **b)** TGT-5.5_{CO}^{C2} (PDB ID: 5J9N; weinrot) und TGT-5.6_{CO}^{C2} (PDB ID: 5JT6; cyan), **c)** TGT-5.7_{CO}^{C2} (PDB ID: 5J9O; blau) und TGT-5.8_{CO}^{C2} (PDB ID: 5JT7; cyan), **d)** TGT-5.9_{CO}^{C2} (PDB ID: 3S1G^[114]; orange) und TGT-5.10_{CO}^{C2} (PDB ID: 4Q4R^[119]; cyan), **e)** TGT-5.11_{SOAK}^{C2} (PDB ID: 4PUK^[118]; grau) und TGT-5.12_{SOAK}^{C2} (PDB ID: 4PUJ^[118]; cyan) und **f)** apo-TGT (PDB ID: 1POD^[86]; hellgrün) und preQ₁ (PDB ID: 1POE^[86]; braun). Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. Distanzen sind als grau gestrichelte Linien dargestellt und in Å angegeben. Wassermoleküle und Distanzen sind im Farbton der jeweiligen Struktur eingefärbt.

Die Reorganisation des Proteins und die Erweiterung der Bindetasche sind abhängig von dem Substituenten des Benzimidazol-Grundgerüsts. Das primäre Amid stabilisiert die geschlossene Konformation, die bis dato in nahezu allen TGT·Ligand-Komplexen aufzufinden war. Die Erweiterung des Amids durch eine zusätzliche Aminogruppe zu einem Hydrazid führt zu der strukturellen Änderung. In diesem Fall übt die terminale Aminogruppe des Hydrazids sterischen Druck auf Asp156 aus und induziert so die Proteinumlagerung, bzw. führt zu ihrer Stabilisierung. Die Guanidin-substituierten Liganden zeigen aufgrund der Solvatisierung der Aminosäuren Gly230 und Gln203 die gleiche Reorganisation des Enzyms. Das Wassermolekül W_1 und die geringfügige räumliche Verschiebung von Asp156 sind dafür verantwortlich. Eine quantitative energetische Aufteilung in einzelne Wechselwirkungsbeiträge ist jedoch kaum möglich, da die Veränderungen sehr vielschichtig und komplex sind. Der neu entstandene Hohlraum wird von mehreren Wassermolekülen besetzt und stabilisiert, was für den hydrophilen Charakter der Tasche spricht (**Abbildung 5.11**). In TGT·**5.7**_{co}^{C2} und TGT·**5.8**_{co}^{C2} kann ein komplexes Wassernetzwerk mit kurzen Distanzen zwischen 2.5 und 3.5 Å detektiert werden, das partiell auch in TGT·**5.5**_{co}^{C2} und TGT·**5.6**_{co}^{C2} zu finden ist. Die Carbonylgruppen der Aminosäuren Glu157, Thr159, Ala168 und Gly230 und die Rückgrat-Amid Stickstoffe von Gly204, Ser205 und Thr159 ragen in Richtung der erweiterten Tasche. Zusätzlich können die Seitenketten von Gln203, Ser171 und Ser205 H-Brücken zu den Wassermolekülen ausbilden (**Abbildung 5.11**).

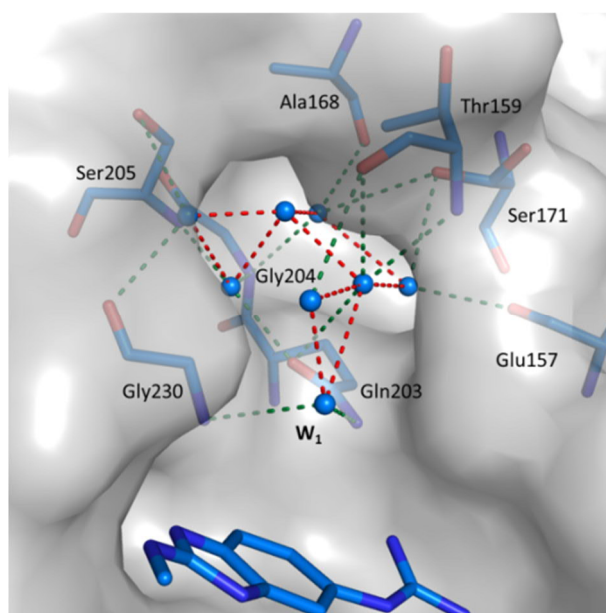


Abbildung 5.11. Wassernetzwerk in der transienten Taschenerweiterung der Guanin/preQ₁-Bindetasche in TGT·**5.7**_{co}^{C2}. Ligand und beteiligte Aminosäuren des Wassernetzwerks sind als hellblaue Stäbchen dargestellt. Sauerstoff rot, Stickstoff blau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken der Protein-Wasser-Kontakte sind als grün, Wasser-Wasser-Kontakte als rot gestrichelte Linien dargestellt. Distanzen zwischen 2.5 und 3.5 Å. Wassermoleküle sind als blaue Kugeln dargestellt.

5.3.3 Vergleich der Taschenerweiterungen der Guanin/preQ₁-Bindetasche von bakterieller und humaner TGT

Die TGT aus bakteriellen Organismen, z.B. aus *Z. mobilis*, bauen als Homodimere die modifizierte Base preQ₁ anstelle von Guanin-34 in bestimmte tRNAs ein (**Kapitel 1**)^[68, 71]. In Folge wird diese modifizierte Base auf tRNA Ebene zu Queuin umgewandelt^[81, 85]. Im Gegensatz dazu bauen viele eukaryotische TGTs als Heterodimere, wie die humane TGT, sofort Queuin in Position-34 der tRNA ein^[178, 179]. Da die Base Queuin noch eine zusätzliche Dihydroxy-Cyclopentenylgruppe als Rest an der Position des Methylenaminorests von preQ₁ besitzt, benötigen eukaryotische TGTs für den direkten Einbau eine größere Bindetasche. Ein Homologiemodell der katalytischen Untereinheit der eukaryotischen *Caenorhabditis elegans* TGT suggeriert, dass dies hauptsächlich durch den Austausch der Aminosäuren Val233 zu Glycin (*Z. mobilis* TGT Nummerierung) in der aktiven Tasche gewährleistet wird^[83, 180]. Ein weiterer Aminosäureaustausch könnte die Substratspezifität von eukaryotischen TGTs wesentlich mitentscheiden: Cystein158 zu Valin (*Z. mobilis* TGT Nummerierung). Weiterhin zeigte das Homologiemodell, dass die Bindetaschen von bakterieller und eukaryotischer TGT eine hohe strukturelle Ähnlichkeit aufweisen und dass nur kleine Änderungen der *Z. mobilis* TGT nötig sind, um aus der bakteriellen TGT ein Abbild der eukaryotischen bzw. humanen TGT zu erstellen^[180]. Da von einer eukaryotischen TGT, bzw. deren katalytischen Untereinheit, bisher noch keine Kristallstrukturen erhalten werden konnte, wurde von Dr. Naomi Tidten vor einigen Jahren eine mutierte Variante der *Z. mobilis* TGT anhand der Sequenz der humanen TGT erstellt, aufgereinigt und kristallisiert TGT(Cys158Val/Val233Gly/Tyr106Phe, PDB ID 3BLO)^[83, 175]. Das berechnete Volumen der aktiven Bindetasche der nachgebildeten humanen TGT beträgt 650 Å³. Ein ähnliches Volumen (600 Å³) konnte auch für das Homologiemodell der humanen TGT berechnet werden. Im Vergleich zur bakteriellen *Z. mobilis* TGT (250 Å³) ist der Volumenzuwachs enorm. Jedoch erreicht die Bindetasche der *Z. mobilis* TGT in der MD-Simulation ein noch größeres Volumen (750 Å³; **Tabelle 5.2**). Diese vergrößerte Bindetasche entspricht wahrscheinlich jener, die in der vorliegenden Arbeit mit den Benzimidazolen **5.5** – **5.8** kristallographisch festgestellt werden konnte. Ein Vergleich der räumlichen Anordnung der Taschenerweiterungen zwischen den neuen Kokristallstrukturen und dem Homologiemodell des humanen Enzyms zeigt eine sehr große Ähnlichkeit (**Abbildung 5.12**). Erst kürzlich konnte durch Trapping-Experimente gezeigt werden, dass Queuin ein möglicher Inhibitor der *Z. mobilis* TGT ist. Im Radioaktivassay, der zum Bestimmen der inhibitorischen Wirkung von Substanzen gegenüber der *Z. mobilis* TGT verwendet wird, zeigte sich, dass Queuin mit $K_i = 3.8 \pm 0.5 \mu\text{M}$ eine vergleichsweise hohe Affinität gegenüber der *Z. mobilis* TGT besitzt^[83].

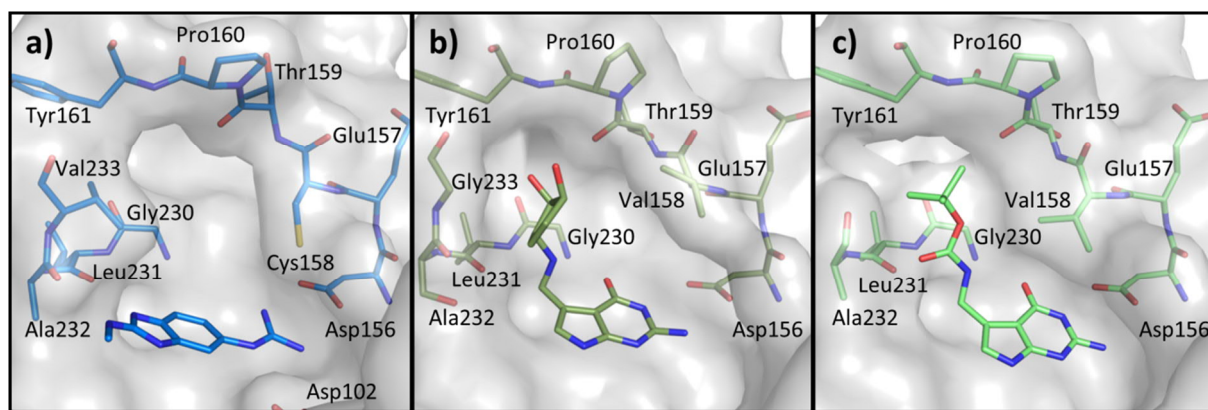


Abbildung 5.12. Vergleich der Taschenerweiterung der Guanin/preQ₁-Bindetasche in bakterieller und „humanisierter“ TGT. **a)** TGT-**5.7**^{C₂} (PDB ID: 5J90; blau), **b)** TGT(Cys¹⁵⁸Val/Val²³³Gly/Tyr¹⁰⁶Phe)/Queuin (PDB ID: 3BLO^[83]; dunkelgrün), **c)** TGT(Cys¹⁵⁸Val / Val²³³Gly / Tyr¹⁰⁶Phe)/Boc-preQ₁ (PDB ID: 3BLL^[83]; hellgrün). Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb.

5.3.4 Erster Versuch die neue Taschenerweiterung zu adressieren

Der Guanidin-substituierte Ligand **5.7** wurde als mögliche Leitstruktur zur weiteren Optimierung gewählt. Dies erfolgte hauptsächlich aufgrund der hohen Löslichkeit der Substanz und der Möglichkeit an C(5) des bityklischen Benzimidazols einen Substituenten zu addieren, der die Taschenerweiterung induziert und möglicherweise stabilisiert. Ein weiterer Vorteil ist die Bildung von Salzbrücken zwischen dem Guanidin-Teil und den Seitenketten der Aminosäuren Asp102 und Asp156. Die Anpassung des Enzyms an einen Liganden, der perfekt in die negativ geladene Umgebung der Aspartate bindet, könnte durch die Bildung einer intramolekularen H-Brücke realisiert werden (**Abbildung 5.13a** (Konformation A)). Dies wäre verbunden mit der Ausbildung eines siebengliedrigen Rings, der gegebenenfalls in der Proteinumgebung stabilisiert werden könnte obwohl er aus sterischen Gründen als wenig begünstigt gelten muss. Um unsere vorgeschlagene Strategie zu validieren, wurde ein Ethylether als Substituent gewählt. Eine Erweiterung der Ethylethergruppe würde die vollständige Besetzung der neuen Subtasche ermöglichen. In einer mit MOLOC^[181] erstellten Docking-Struktur (**Abbildung 5.13b**), kommt die Ethergruppe auf der Position des Wassers **W₁**, welches Gly230 und Gln203 solvatisiert, zum Liegen. In dieser Struktur bildet Ligand **5.12** H-Brücken zu Asp102 und Asp156 (2.8 – 3.1 Å). Weitere Interaktionen zu den Carbonylfunktionen der Aminosäuren Ala232 und Leu231 können mit Abständen von 2.9 und 3.1 Å erhalten bleiben. Eine intramolekulare H-Brücke zwischen dem Ethersauerstoff und der positiv geladenen NH₂⁺-Gruppe des Guanidins (2.7 Å) würde die Konformation A des Inhibitors stabilisieren und dabei den beschriebenen siebengliedrigen Ring ausbilden.

5. Benzimidazol-basierte Liganden bestätigen erweiterte Guanin/preQ1-Bindetasche

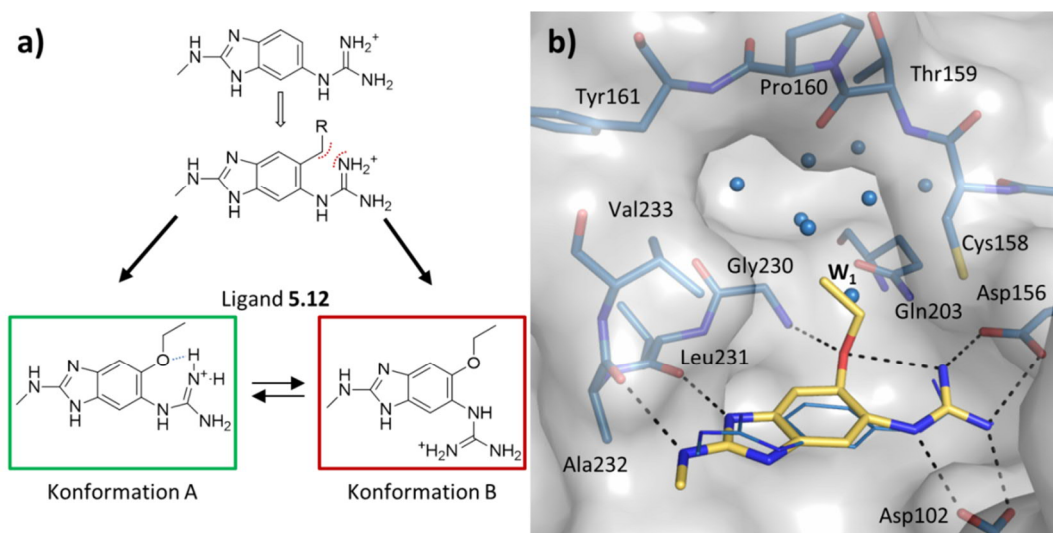


Abbildung 5.13. a) Design des Liganden **5.12**, der die Taschenerweiterung besetzt, b) Docking Struktur von Ligand **5.12** (Kohlenstoff gelb) basierend auf Ligand **5.7** (Kohlenstoff blau; dünne Linien). Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb. H-Brücken sind als schwarze gestrichelte Linien dargestellt.

Letztendlich ergaben allerdings mehrere Kokristallisationsansätze keine Differenzelektronendichte des gebundenen Liganden. Wahrscheinlich nimmt, aufgrund von sterischen Wechselwirkungen zwischen dem Guanidin und dem Sauerstoff der Ethylethergruppe, der Ligand Konformation B ein und verhindert so die Ausrichtung des neuen Substituenten in die Taschenerweiterung und die Bindung des Liganden. Eine Abfrage der CSD (*Cambridge Structural Database*) mit Hilfe des Programms ConQuest^[182], wie der Guanidin-Teil und der Aromat des Benzimidazol-Grundgerüst zueinander ausgerichtet sein kann, ergab, dass in keinem Eintrag der CSD die Ebene „Aromat“ und die Ebene „Guanidin“ annähernd planar vorliegen, wenn sie nicht durch eine kovalente Bindung verknüpft sind. Durch Anfügen von sterischen Substituenten (hier an C(5)) ist es daher äußerst unwahrscheinlich, dass sich die Konformation A bei Ligand **5.12** ausbildet. Daher werden zurzeit weitere alternative Leitstrukturen (**Abbildung 5.14**) entwickelt, synthetisch realisiert und folgend tiefgehend untersucht.

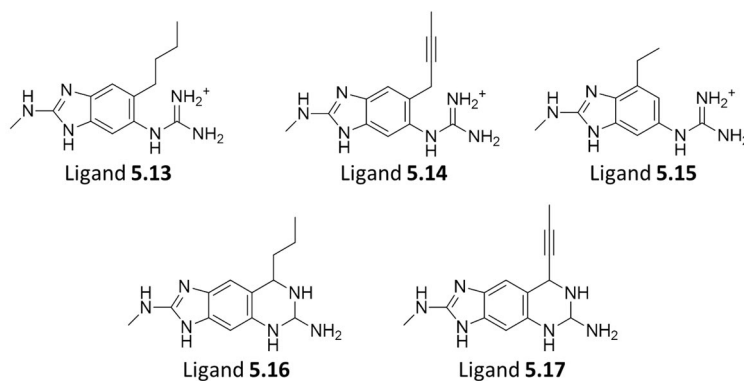


Abbildung 5.14. Mögliche Inhibitoren, die die neue Taschenerweiterung adressieren könnten. **5.15 – 5.17** sind am vielversprechendsten, um die transiente Taschenerweiterung zu adressieren.

5.4 Zusammenfassung

In diesem Kapitel wurde eine Serie von Benzimidazol-basierten Liganden (**5.1 – 5.8**) vorgestellt. Das Design dieser Serie war nicht im Hinblick einer Bindungsaffinitätssteigerung gegenüber der *Z. mobilis* TGT entwickelt worden, sondern der Fokus lag auf der Untersuchung der essentiellen Aminosäuren in der Guanin/preQ₁-Bindetasche (Asp102, Asp156, Gln203, Gly230) und auf dem Vergleich zu den etablierten *lin*-Benzopurinen (**5.9 – 5.12**). Wie zu erwarten, konnte kein Affinitätsgewinn gegenüber den *lin*-Benzopurinen erreicht werden, jedoch bestätigten die Benzimidazole essentielle Wechselwirkungen zu den umliegenden Aminosäuren. Die Entdeckung einer bisher kristallographisch unbekannten neuen transienten Taschenerweiterung im Bereich der Guanin/preQ₁ Erkennungsstelle, eröffnet jedoch die Entwicklung von neuen Inhibitoren im Kampf gegen die Bakterienruhr. Durch die Kokristallstrukturen der Hydrazid- (**5.5** und **5.6**) und Guanidin-substituierten (**5.7** und **5.8**) Liganden konnte eine bereits im Jahr 2007 durchgeführte MD-Simulation an dem *Z. mobilis* TGT-Enzym, die auf eine transiente Taschenerweiterung hinwies, kristallographisch bestätigt werden. Die MD-Simulation zeigte, dass sich die Größe der apo-TGT Bindetasche bis zu einem Faktor 3 erweitern kann, ohne dass dies durch den Einfluss eines Inhibitors induziert wird. Diese Erweiterung kann offensichtlich durch die Hydrazid- und Guanidin-substituierten Benzimidazole stabilisiert werden. Die mit dem primären Amid substituierten Liganden (**5.1** und **5.2**), die die Taschenerweiterung nicht induzieren, inhibieren die TGT im dreistellig mikromolaren Bereich. Im Vergleich zu den *lin*-Benzohypoxanthinen fällt ihre Bindungsaffinität allerdings um den Faktor 46 bis 132 stark ab. Die erhaltenen Kokristallstrukturen mit diesen Liganden offenbaren einen sehr ähnlichen Bindungsmodus, allerdings ist das Wassernetzwerk zwischen den Liganden und Asp102 nicht mehr feststellbar. Der Stickstoff N(5) des *lin*-Benzohypoxanthin-Grundgerüsts agiert an dieser Stelle als H-Brückenakzeptor und formt so eine H-Brücke zu dem Wasser **W₄** des Wassernetzwerks.

Der Verlust dieses H-Brückenakzeptors kann den Affinitätsverlust erklären und legt nahe, dass eine erhöhte Flexibilität der Carboxylatfunktion von Asp102 vorliegt. Diese wird in den Kokristallstrukturen durch die zwei Konformationen dieser Seitenkette angedeutet. Im Gegensatz zu allen bisher bekannten Kristallstrukturen der *Z. mobilis* TGT im Komplex mit Liganden weisen die Hydrazid-substituierten Liganden erhöhte Flexibilität in der Guanin/preQ₁-Bindetasche auf. Die in *trans*-Konformation vorliegende Hydrazidgruppe übt sterischen Druck auf die Aminosäure Asp156 aus, die dadurch um bis zu 0.9 Å aus dem Taschenbereich verdrängt wird. Die damit verbundene Veränderung der Sekundärstruktur zwischen den Aminosäuren Glu157 und Thr161 und vor allem das induzierte Wegrotieren der Seitenkette von Cys158 öffnen einen Zugang zu einem neuen Hohlraum. Diese strukturelle Änderung verläuft, verglichen mit den Amid-substituierten Benzimidazole, nicht parallel mit einem Affinitätsverlust.

Bei den Guanidin-substituierten Liganden fehlt im Vergleich zu den *lin*-Benzopurinen die Carbonylgruppe im Aminopyrimidinzyklus, welche mit Gly230 und Gln203 in den Kristallstrukturen der *lin*-Benzopurine interagiert. Anstelle der Carbonylgruppe konnte ein Wassermolekül (**W₁**) in den Kokristallstrukturen festgestellt werden, welches die genannten Aminosäuren solvatisiert. Gemeinsam mit der Verschiebung von Asp156 und der Inkorporation des Wassermoleküls **W₁** führt dies wie bei den Hydrazid-basierten Benzimidazolen zu der gleichen strukturellen Neuausrichtung des Proteins. Der Erhalt der Interaktion zu Asp102 und Asp156 erklärt den etwas geringeren Affinitätsverlust auf ein zweistelliges mikromolares Niveau. Trotzdem kann der Verlust der Interaktionen zu Gly230 und Gln203 nicht kompensiert werden.

Der Austausch des Aminomethyl- gegenüber eines Morpholinoethylamin-Substituenten an C(2) auf der gegenüberliegenden Molekülseite ergab entgegen den Erwartungen keinen Affinitätsgewinn und sogar im Fall der Guanidin-substituierten Liganden eine um den Faktor 3 reduzierte Bindungsaffinität.

Der Vergleich der hier vorgestellten Benzimidazole unterstreicht, dass minimale Veränderungen am Liganden deutliche strukturelle Veränderungen am Protein nach sich ziehen, bzw. biologisch relevante Konformationen stabilisieren können. Größere Ligand-induzierte strukturelle Veränderungen wurden, wie in **Kapitel 3** und **7** beschrieben, bei der *Z. mobilis* TGT bisher nur in der Ribose-34-Tasche beobachtet. Ein erster Versuch, die Taschenerweiterung zu adressieren misslang, da der entwickelte Ligand vermutlich nicht die benötigte Geometrie bevorzugt. Weitere Liganden werden entwickelt und sollen in der nahen Zukunft tiefgehend untersucht werden.

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguaninen

6.1 Vorwort

Die beiden in diesem Abschnitt neu präsentierten Liganden **6.1** und **6.2** wurden in Kooperation mit Elisabeth Schäfer (Arbeitsgruppe Prof. Dr. François Diederich, ETH Zürich, Schweiz) entwickelt. Elisabeth Schäfer war für die Synthese und Aufreinigung der Liganden zuständig. Die Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT, ITC Titrationsen zum Erhalt der thermodynamischen Profile und der Bindungsaffinitäten, als auch die röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden vom Autor dieser Arbeit durchgeführt.

6.2 Einleitung

In **Kapitel 2** wurde anhand von Kokristallstrukturen der an C(4) mit Furanosen substituierten *lin*-Benzoguaninen und dem *Z. mobilis* TGT-Enzym gezeigt, dass die Monosaccharid-Reste der Inhibitoren nahezu deckungsgleich mit der Phosphatgruppe-35 der tRNA innerhalb der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche binden. Des Weiteren zeigten die Kokristallstrukturen, dass die Furanosen ein konserviertes Wassernetzwerk ladungsneutral (**Abbildung 2.2c**) ersetzen und mehrere Wasserstoffbrücken (H-Brücken) mit den umgebenden Aminosäuren der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche ausbilden. Die untersuchten Inhibitoren erzielten Bindungsaffinitäten im dreistellig nanomolaren Bereich (**Tabelle 2.1**). Diese Beobachtung führte zu der vielversprechenden Erkenntnis, dass Furanoside verwendet werden können, um Phosphatbindetaschen zu adressieren. Daraufhin wurde die Entwicklung von an C(2) des trizyklischen Grundgerüsts angefügten Psicofuranosen vorangetrieben (**Abbildung 6.1**), die so die Lösungsmittel-exponierte Ribose-33/Phosphate-34-Tasche (in Folge nur Ribose-33-Tasche) adressieren sollen. In der vorliegenden Studie wurden aus einer Serie von sechs Liganden (**Abbildung 6.1**) bisher zwei hochaffine Liganden **6.1** und **6.2** erhalten. Diese beiden Inhibitoren sind in zwei hoch aufgelösten Kokristallstrukturen mit dem TGT-Enzym komplett zu identifizieren. Die an C(2) des trizyklischen Grundgerüsts angefügten Monosaccharide liegen trotz weniger direkter Wechselwirkungen mit dem Protein zu 100% populierte in jeweils einer Konformation vor. Weitere Liganden der Serie sind zurzeit in Synthese und Aufreinigung. Die Synthese mit bis zu 14 Stufen stellt sich allerdings als sehr anspruchsvoll dar. Aufgrund von Schwierigkeiten die mit dem Anbringen von Schutzgruppen für die Hydroxylgruppen (OH-Gruppe) und der stereoselektiven Verknüpfung der Monosaccharide mit dem trizyklischen Grundgerüst zusammenhängen, müssen alternative Synthesewege etabliert werden. Ähnlich wie in **Kapitel 2** soll anhand der aufgeklärten Kokristallstrukturen der Einfluss der Liganden auf die Wasserstruktur und die ladungsneutrale Verdrängung von Wassermolekülen untersucht werden. Dafür wurden die Liganden mit *Z. mobilis* TGT kokristallisiert und mittels ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) auf ihr thermodynamisches Profil untersucht. Des Weiteren ermöglicht die ITC-Methode das Protonierungsverhalten des Ligand-Protein Systems während der Komplexbildung mit dem Enzym zu untersuchen.

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguaninen

Die Liganden **6.1** und **6.2** sind jeweils an C(2) des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüsts unterschiedlich substituiert (**Abbildung 6.1**, **Tabelle 6.1**). Beide Liganden verfügen über eine Aminomethyl-Psicofuranose als Substituent. Bei **6.1** sind die 2'- und 3'-OH-Gruppe mit einer Acetonid-Schutzgruppe versehen, während die 1'-OH-Gruppe einfach methyliert vorliegt. Bei **6.2** sind sowohl die zwei OH-Gruppen 2' und 3' mit einer Acetonid-Schutzgruppe, als auch die OH-Gruppe 1', mit einer Acetonid-ähnlichen-Schutzgruppe versehen. Durch die Verbindung der zwei zyklischen Systeme in **6.2** liegt nun an C1' der Psicofuranose ein Spirozentrum vor.

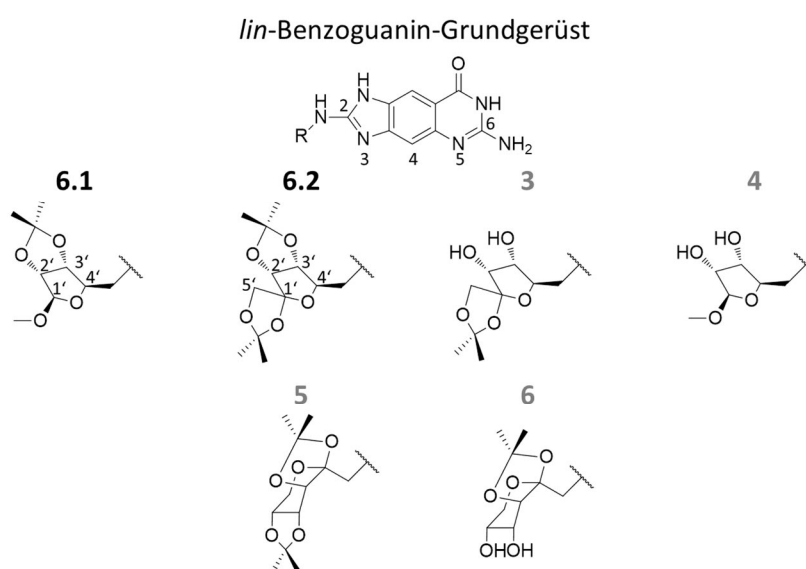


Abbildung 6.1. Serie von C(2)-Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguaninen. **6.1** und **6.2** werden in diesem Kapitel beschrieben. **3 – 6** (grauer Schriftzug) sind in Synthese bzw. Aufreinigung. **6.1**, **6.2** und **3**, **4** basieren auf einem Psicofuranose-Baustein. **5** und **6** basieren auf Fructose als Monosaccharid-Komponente.

Gewöhnlich erfährt ein Ligand in tief vergrabenen Bindetaschen wichtige Beiträge zur Bindungsaffinität. Im Fall der Derivate des *lin*-Benzoguanins, die mit an C(2) angefügten Substituenten die flache Lösungsmittel-exponierte Ribose-33-Tasche adressieren, wurden jedoch auch dort deutliche Affinitätssteigerungen festgestellt^[3, 12, 115]. In solch flachen Bindetaschen werden in der Regel höhere Restbeweglichkeiten von Ligand-Substituenten beobachtet. In einer Serie von Thermolysin-Inhibitoren, die ihre unterschiedlichen P2'-Substituenten ebenfalls in eine flache, zum Lösungsmittel exponierte Tasche orientieren und die sich in ihrer Größe und Hydrophobizität unterscheiden, wurde sowohl ein deutlicher Einfluss der ersten und zweiten Hydratationsschale, als auch die Restflexibilität der Liganden, auf die Bindungsaffinität und das thermodynamische Enthalpie/Entropieprofil festgestellt^[3, 83, 101].

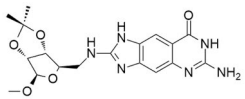
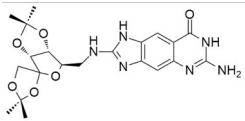
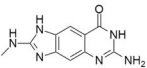
6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten lin-Benzoguaninen

Substituenten an C(2) der *lin*-Benzoguanine ragen in die flache schalenförmige Ribose-33-Tasche, die während der Katalyse Teile des natürlichen tRNA-Substrats beherbergen (**Abbildung 6.6**)^[12, 16, 115]. Substituenten an C(4) der *lin*-Benzoguanine, wie sie in **Kapitel 2, 3** und **7** beschrieben werden, ragen hingegen in eine vergrabene, teils hydrophobe Tasche, die die Ribose-34 und die Phosphatgruppe-35 der tRNA umschließt^[1, 14-16].

In mehreren Studien wurde zuvor gezeigt, dass die Adressierung der Ribose-33-Tasche mit unterschiedlichen Substituenten in den meisten ermittelten Kristallstrukturen mit einer erhöhten Beweglichkeit der Substituenten bzw. einer Streuung über mehrere Konformationen in unterschiedlichem Ausmaß verbunden ist^[3, 115]. Diese Beobachtung legt nahe, dass die C(2)-Substituenten abhängig von ihrer chemischen Zusammensetzung eine ausgeprägte Flexibilität im gebundenen Zustand erfahren. Diese dynamischen Eigenschaften drücken sich in erhöhten *B*-Faktoren der Atome oder in einer reduzierten Besetzung der Substituenten in den Kristallstrukturen aus. Demnach gelten reduzierte Besetzungen oder erhöhte *B*-Faktoren der Atome als qualitative Indikatoren für Restbeweglichkeit von Liganden in ihrem gebundenen Zustand am Protein^[3, 14, 118].

6.3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 6.1. Struktur, Bindungsaffinitäten und thermodynamische Daten bei den verwendeten Puffersystemen.

Ligand	Struktur	K_d [nM]	ΔG^0 [kJ·mol ⁻¹]	Puffer	$\Delta H^0_{\text{obs}}/\Delta H^0_{\text{bind}}$ [kJ·mol ⁻¹]	$-T\Delta S^0$ ^[a] [kJ·mol ⁻¹]
6.1		14 ± 7	-45.0 ± 0.7	HEPES	-64.2 ± 1.9	19.6 ± 3.8
				Tricin	-53.0 ± 2.3	7.4 ± 3.3
				TRIS	-42.3 ± 0.4	-2.4 ± 0.9
				Ion. korrigiert	-79.5	34.5
6.2		32 ± 13	-43.0 ± 0.4	HEPES	-55.9 ± 3.2	12.5 ± 1.6
				Tricin	-45.5 ± 3.2	2.9 ± 0.3
				TRIS	-34.6 ± 0.6	-9.9 ± 0.9
				Ion. korrigiert	-71.1	28.1
6.3		52 ± 7 ^[b]	-41.6 ± 0.3 ^[b]	HEPES	-74.8 ± 1.8 ^[b]	34.2 ± 1.9 ^[b]
				Tricin	-66.7 ± 0.1 ^[b]	25.1 ± 0.3 ^[b]
				TRIS	-50.9 ± 0.9 ^[b]	-9.3 ± 0.9 ^[b]
				Ion. korrigiert	-93.6	52.0

Der entsprechende Graph, um die hinsichtlich der Ionisierungsenthalpie der verwendeten Puffer korrigierten Werte (Ion. korrigiert) von **6.1**, **6.2** und **6.3** zu erhalten, ist in **Abbildung 6.7a** dargestellt. Die angezeigten Fehler sind Standardabweichungen aus mindestens drei Messungen. ^[a]- $T\Delta S^0$ wurde mit der Gibbs-Helmholtz-Gleichung berechnet (**Gleichung 11.6.2.2**). ^[b]Neeb et al. (2014)^[118].

6.3.1 Kokristallstrukturen der C(2)-Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguanine

Mit **6.1** und **6.2** wurden zwei hochaufgelöste Kokristallstrukturen (TGT·**6.1**_{CO}^{C2}, 1.17 Å und TGT·**6.2**_{CO}^{C2}, 1.22 Å) mit dem *Z. mobilis* TGT-Enzym erhalten. Diese beiden Kokristallstrukturen beinhalten die Liganden mit einer komplett definierten und gut aufgelösten Differenzelektronendichte (**Abbildung 6.2 & 6.3**). Die trizyklischen Grundgerüste von **6.1** und **6.2** bilden acht H-Brücken zu den Seitenketten von Asp102, Asp156 und Gln203, dem Amid-Stickstoff von Gly230 sowie zu den Carbonylgruppen von Ala232 und Leu231. Des Weiteren erfährt der Trizyklus, wie bei allen anderen *lin*-Benzoguanin Liganden zwischen Tyr106 und Met260 vorteilhafte π - π -Wechselwirkungen.

Wie oben beschrieben, wurde in einigen TGT-Ligand-Strukturen festgestellt, dass Substituenten, die die Ribose-33-Tasche adressieren, flexibel sind bzw. über mehrere räumliche Orientierungen verteilt vorliegen können. Auch in der Studie in **Kapitel 5** wurde keine Differenzelektronendichte für einen flexiblen Morpholinoethylamin-Substituenten in den Kokristallstrukturen festgestellt. Für die sterisch etwas anspruchsvolleren und weniger flexiblen Psicofuranosen **6.1** und **6.2** wurde allerdings eine 100% Besetzung der Substituenten in der Bindetasche festgestellt. Im Vergleich zu den trizyklischen Grundgerüsten sind allerdings die *B*-Faktoren der C(2)-Substituenten von **6.1** ca. um den Faktor 2.1 und bei **6.2** um den Faktor 2.5 erhöht. Eine Überlagerung der Kokristallstrukturen TGT·**6.1**_{CO}^{C2} und TGT·**6.2**_{CO}^{C2} offenbart, dass die Psicofuranosen der zwei Liganden offensichtlich nicht deckungsgleich in der Ribose-33-Tasche liegen (**Abbildung 6.4**).

In TGT·**6.1**_{CO}^{C2} bildet der 1'-Sauerstoff der Psicofuranose eine schwache Wasser-vermittelte H-Brücke zur Seitenkette einer der alternativen Konformationen von Arg286 ((*D*)*istanz*: 3.1 & 3.4 Å) aus. Der endozyklische Psicofuranose-Sauerstoff ragt in Richtung Ribose-34-Tasche und interagiert ebenfalls über eine Wasser-vermittelte H-Brücke (über Wasser **W_t**) mit dem Amid-Stickstoff von Val282 (*D*: 2.8 & 2.9 Å). Gleichzeitig bildet der endozyklische Psicofuranose-Sauerstoff eine H-Brücke zu dem Wasser **W₁**, das sich an der Ausbildung eines fünfgliedrigen Wassernetzwerkes beteiligt. Während für den 2'-Sauerstoff keine direkte Interaktion festzustellen ist, bildet der 3'-Sauerstoff eine schwache H-Brücke zu Wasser **W₆** des genannten Wassernetzwerkes aus (*D*: 3.2 Å).

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten lin-Benzoguaninen

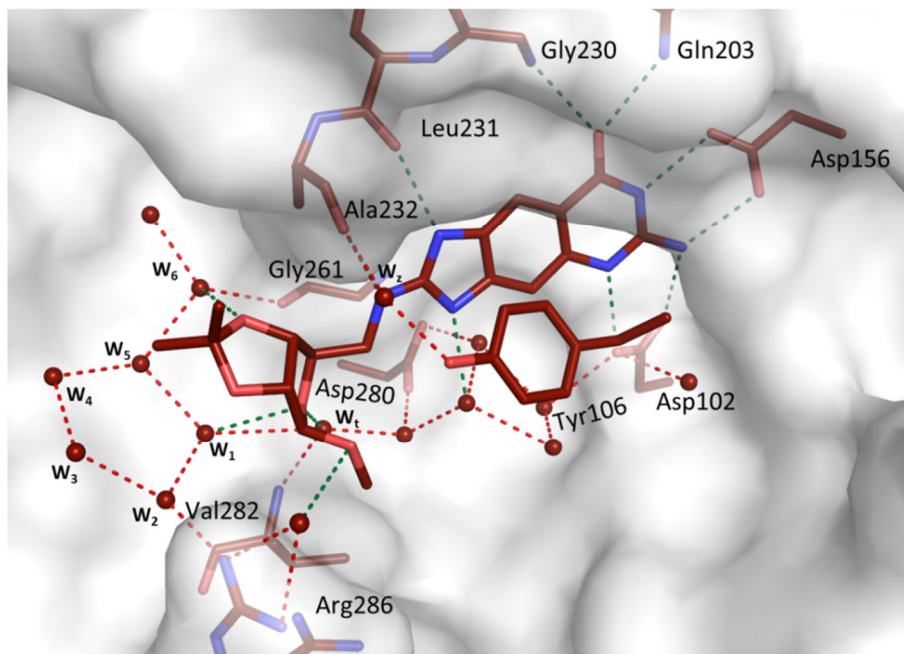


Abbildung 6.2. Kokristallstruktur TGT-6.1_{co}^{c2} (PDB ID: 5JSV; Kohlenstoff dunkelrot). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken des Liganden sind als grüne, Wasser-Wasser- bzw. Wasser-Protein-Kontakte als rot gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.5 und 3.5 Å). Met260 ist zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Wassermoleküle sind als dunkelrote Kugeln angezeigt.

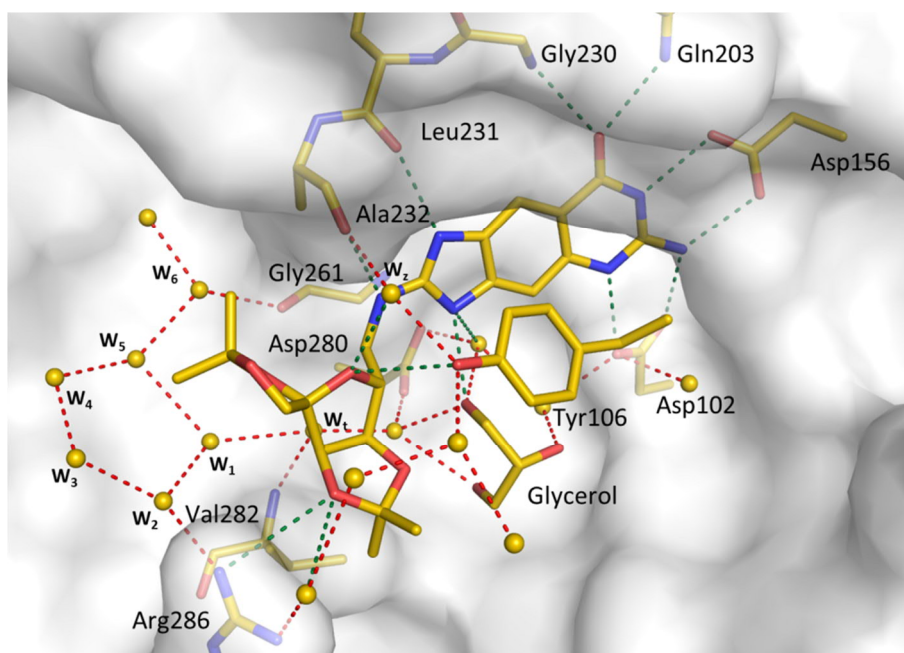


Abbildung 6.3. Kokristallstruktur TGT-6.2_{co}^{c2} (PDB ID: 5JSW; Kohlenstoff hellgelb). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken mit direktem Kontakt zum Liganden sind als grüne, Wasser-Wasser- bzw. Wasser-Protein-Kontakte als rot gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.5 und 3.5 Å). Met260 ist zur besseren Übersicht nicht dargestellt. Wassermoleküle sind als hellgelbe Kugeln angezeigt.

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten lin-Benzoguaninen

In der Kokristallstruktur TGT-6.2_{CO}^{C2} orientiert sich der 1'-Sauerstoff in Richtung des Lösungsmittels und es kann wie bei dem 5'-Sauerstoff und dem 3'-Sauerstoff keine direkte Interaktion zum Protein oder zu einem der kristallographisch geordneten Wassermoleküle festgestellt werden. Dafür interagiert der 2'-Sauerstoff sowohl direkt mit der Seitenkette von Arg286, als auch indirekt über ein Wassermolekül (*D*: 2.8 – 3.6 Å). Der endozyklische Psicofuranose-Sauerstoff, der in dieser Kokristallstruktur in Richtung Tyr106 ragt, bildet mit einer Distanz von 3.1 Å bzw. 3.2 Å jeweils eine etwas aufgeweiterte H-Brücke zu dem Wassermolekül **W_z** und der OH-Gruppe von Tyr106 aus. Das Wassermolekül **W_z** wird weiterhin über je eine H-Brücke von der OH-Gruppe des Tyr106, als auch der Carbonylgruppe von Ala232 stabilisiert. Die gleiche Stabilisierung ist auch in den Strukturen TGT-6.1_{CO}^{C2} und TGT-6.3_{SOAK}^{C2} (PDB ID: 4PUK^[118]) zu finden (**Abbildung 6.5b & c**). Interessanterweise bindet in TGT-6.2_{CO}^{C2} ein Glycerol-Molekül in der Ribose-34-Tasche, welches eine Vielzahl an H-Brücken zum Lösungsmittel, als auch eine H-Brücke mit 2.8 Å Länge zu dem Stickstoff N(3) des trizyklischen Grundgerüsts ausbildet.

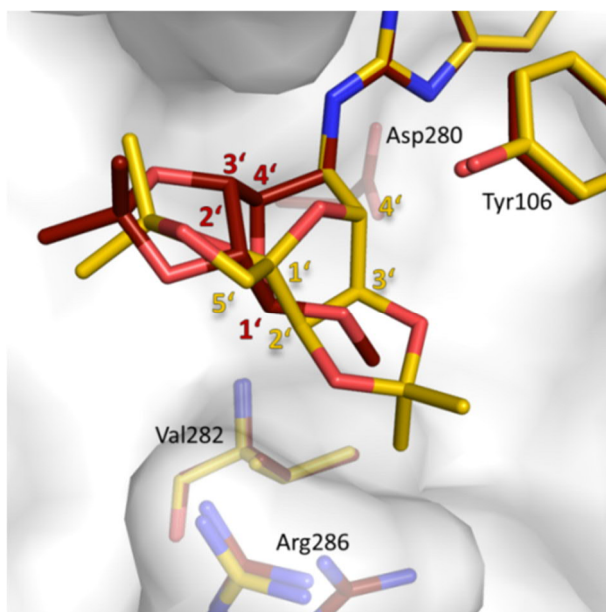


Abbildung 6.4. Überlagerung von TGT-6.1_{CO}^{C2} (Kohlenstoff dunkelrot) und TGT-6.2_{CO}^{C2} (Kohlenstoff hellgelb) mit dem Fokus auf den Psicofuranose-Substituenten. Lösungsmittelzugängliche Oberfläche von TGT-6.1_{CO}^{C2} grau dargestellt.

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten lin-Benzoguaninen

Ein Blick auf die Wasser-Strukturen der Ribose-33-Tasche offenbart, dass sich trotz unterschiedlicher Bindungsmodi der Psicofuranosen von **6.1** und **6.2** trotzdem ein annähernd gleiches Wassernetzwerk ausbildet. Im Zentrum bildet sich dort ein fünfgliedriges Wassernetz ($\mathbf{W}_1 - \mathbf{W}_5$), welches allerdings nur von **6.1** direkt adressiert wird (**Abbildung 6.2**; \mathbf{W}_1 und \mathbf{W}_6). Dieses Wassernetzwerk ist über das Wassermolekül \mathbf{W}_t mit dem Wassernetzwerk der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche (**Abbildung 6.5a,b**) verbunden.

Die Wassermoleküle in der Ribose-33-Tasche in TGT-**6.3**_{SOAK}^{C2} (PDB ID: 4PUK^[118]) haben eine vergleichbare Anordnung wie in den Kokristallstrukturen TGT-**6.1**_{CO}^{C2} und TGT-**6.2**_{CO}^{C2} (**Abbildung 6.5c**). Durch die Psicofuranosen von **6.1** und **6.2** werden im Vergleich zu **6.3** allerdings zwei Wassermoleküle (\mathbf{W}_7 und \mathbf{W}_8) ersetzt. \mathbf{W}_1 wird hingegen in TGT-**6.1**_{CO}^{C2} und TGT-**6.2**_{CO}^{C2} leicht aus der ursprünglichen Position verdrängt, während \mathbf{W}_3 in TGT-**6.3**_{SOAK}^{C2} nicht festzustellen ist. Ein Vergleich mit der Kristallstruktur des apo-TGT Enzyms (PDB ID: 1POD^[86]) zeigt, dass einzelne Wassermoleküle der Ribose-33-Tasche durch die Bindung von **6.1** und **6.2** nicht beeinträchtigt werden (\mathbf{W}_t , \mathbf{W}_1 , \mathbf{W}_4 , \mathbf{W}_5 und \mathbf{W}_6 ; **Abbildung 6.5d**). \mathbf{W}_2 und \mathbf{W}_3 sind nicht Teil der apo-TGT Struktur, was auch auf die geringere Auflösung dieses Kristalldatensatzes zurückzuführen ist (1.9 Å). Das Wassermolekül \mathbf{W}_z , welches in TGT-**6.1**_{CO}^{C2}, TGT-**6.2**_{CO}^{C2} und TGT-**6.3**_{SOAK}^{C2} die Hydroxylgruppe von Tyr106 und den Carbonyl-Sauerstoff von Ala232 solvatisiert, ist nicht vorhanden. Dafür kann neben \mathbf{W}_t noch ein weiteres Wassermolekül (\mathbf{W}_{t2}) festgestellt werden, welches die Wassernetzwerke der Ribose-33 und Ribose-34/Phosphat-35-Tasche verbindet. In der Summe verdrängen die C(2)-Substituenten von **6.1** und **6.2** in der Ribose-33-Tasche die Wassermoleküle \mathbf{W}_{t2} , \mathbf{W}_7 und \mathbf{W}_8 . Aufgrund der Neuorientierung von Tyr106 kann aber das Wassermolekül \mathbf{W}_z in den Kokristallstrukturen festgestellt werden (**Abbildung 6.5**).

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten lin-Benzoguaninen

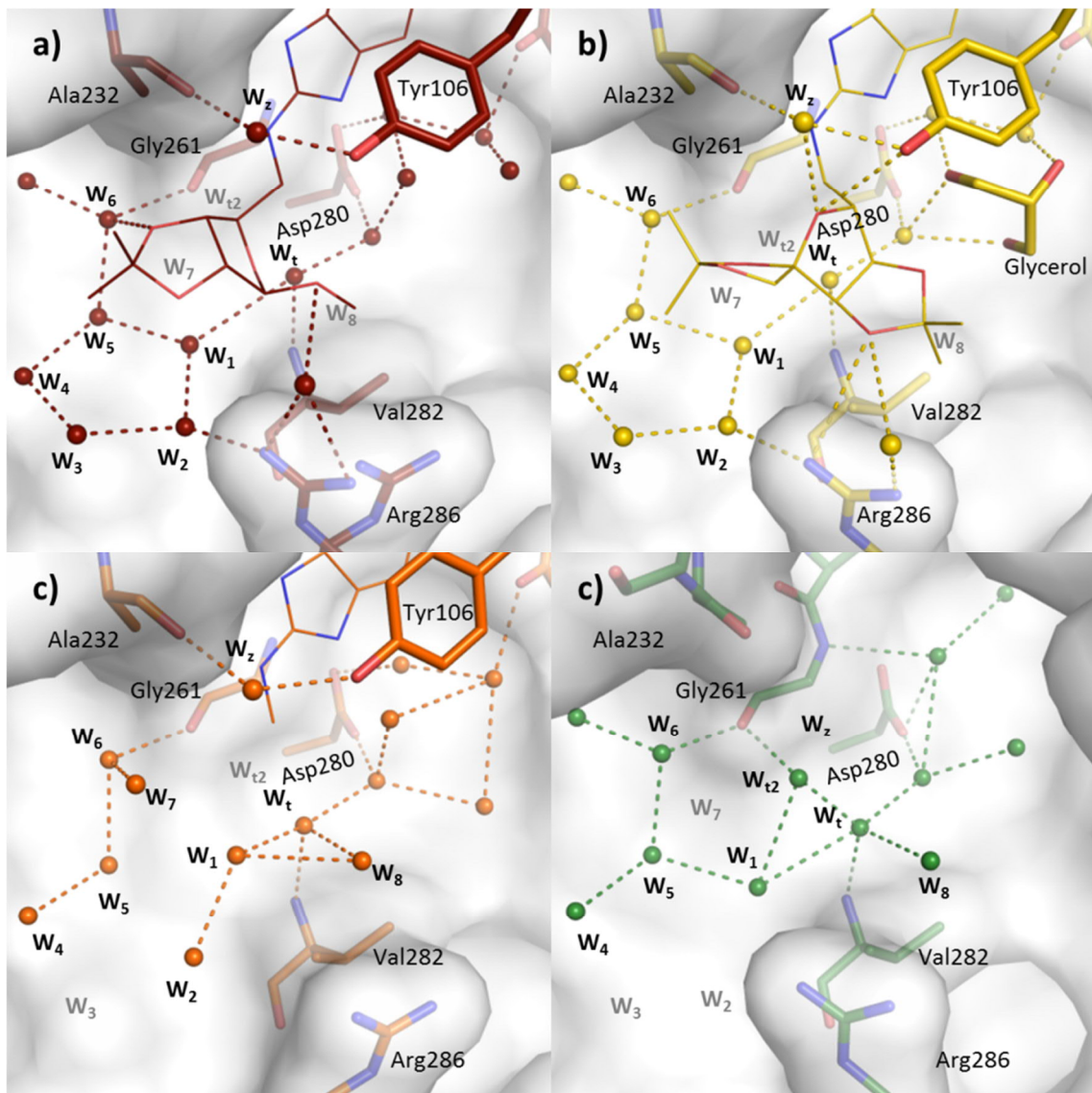


Abbildung 6.5. Darstellung des Wassernetzwerkes in der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche. **a)** TGT-6.1^{CO}^{C2} (Kohlenstoff dunkelrot), **b)** TGT-6.2^{CO}^{C2} (Kohlenstoff hellgelb), **c)** TGT-6.3^{SOAK}^{C2} (Kohlenstoff orange; PDB ID: 4PUK^[118]) und **d)** apo-TGT Struktur (Kohlenstoff grün; PDB ID: 1POD^[86]). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau. H-Brücken sind als gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.5 und 3.6 Å). 6.1 – 6.3 wurden zur besseren Übersicht als dünne Linien dargestellt. Wassermoleküle sind als Kugeln angezeigt und im entsprechenden Komplex gefärbt. W₇, W₈ und W_{t2} (apo-TGT Struktur) werden durch die Substituenten von 6.1 und 6.2 ersetzt. In TGT-6.3^{SOAK}^{C2} wurde W₃ nicht detektiert. W_{t2} wird durch die Aminomethylgruppe von 6.1 ersetzt. Die H-Brücke zwischen W₁ und W₅ beträgt in TGT-6.3^{SOAK}^{C2} 3.9 Å und wurde daher nicht in der Abbildung dargestellt. In der apo-TGT Struktur wurden die Wassermoleküle W₂, W₃ und W₇ nicht detektiert. W_z fehlt ebenfalls in dieser Struktur.

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguaninen

Während bei Ligand **2.6a** und **2.6b** des **Kapitels 2** die Furanosyl-Substituenten nahezu deckungsgleich mit der Phosphatgruppe-35 der RNA binden, zeigt eine Überlagerung der Strukturen von TGT-**6.1**_{CO^{C2}}, TGT-**6.2**_{CO^{C2}} und den TGT-Kristallstrukturen mit gebundenen tRNA-Fragmenten (PDB ID: 1Q2R und 1Q2S^[16]) keine direkte Überlagerung der Monosaccharide mit der Phosphatgruppe-34 und der Ribosegruppe-33 (**Abbildung 6.6**).

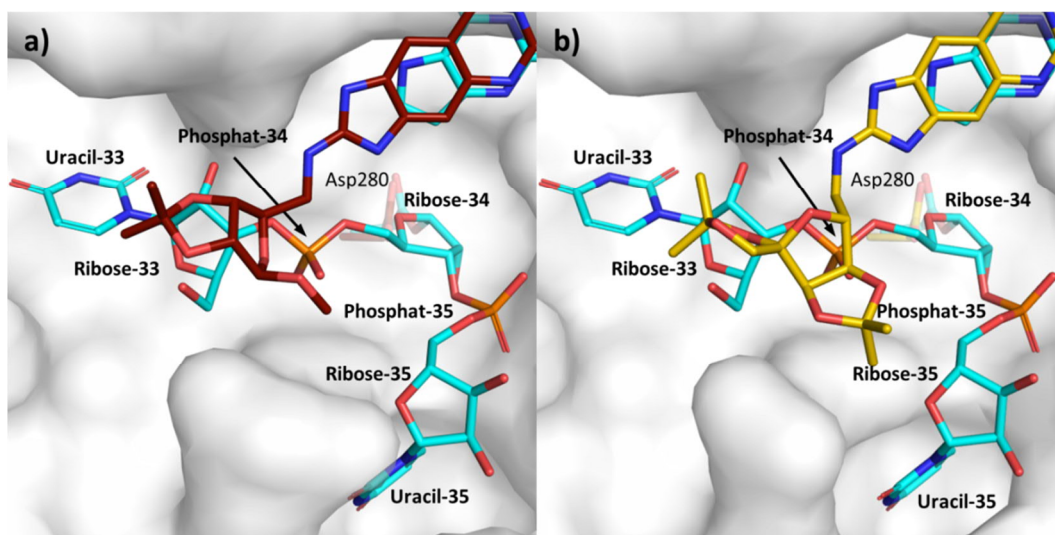


Abbildung 6.6. Überlagerung von tRNA-Fragment (Kohlenstoff cyan; PDB ID: 1Q2R^[16]) und **a)** TGT-**6.1**_{CO^{C2}} (Kohlenstoff dunkelrot) und **b)** TGT-**6.2**_{CO^{C2}} (Kohlenstoff hellgelb). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Phosphat orange. Lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau.

6.3.2 Thermodynamische Signaturen und Bindungsaffinitäten von **6.1** und **6.2**

Wie in **Kapitel 11** beschrieben, ermöglicht die ITC durch Titration eines Liganden in die Lösung des Zielenzym die direkte Bestimmung der Bindungsenthalpie (ΔH_{obs}^0), der Dissoziationskonstante (K_d) und der Bindungsstöchiometrie (n). Diese Parameter werden verwendet, um die Entropie (ΔS_{obs}^0) und die freie Gibbs Energie (ΔG^0) (**Formel 11.6.2.1 & 11.6.2.2**) zu berechnen.

Trotz der strukturell unterschiedlichen Ausrichtungen der Psicofuranosen an C(2), zeigen die Inhibitoren **6.1** ($K_d = 14 \pm 7$ nM) und **6.2** ($K_d = 32 \pm 13$ nM) nur geringfügige Unterschiede in ihrer Bindungsaffinität (Faktor 2.3; **Tabelle 6.1**). Dies ist umso bemerkenswerter, da der strukturelle Unterschied zwischen **6.1** und **6.2** auf eine komplett unterschiedliche Orientierung der C(2)-Substituenten zurückzuführen ist (**Abbildung 6.4**). Im Vergleich zu dem unsubstituierten *lin*-Benzoguanin **6.3**, ist die Bindungsaffinität bei **6.1** um den Faktor 3.7 und bei **6.2** um den Faktor 1.6 erhöht.

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten lin-Benzoguaninen

Interessanterweise können im Vergleich zu **6.1** bei **6.2** sowohl die direkten H-Brücken zwischen dem endozyklischen Psicofuranose-Sauerstoff und Tyr106, als auch zwischen dem 2'-Sauerstoff des Psicofuranosen-Substituenten und Arg286, keinen Affinitätsgewinn erbringen. In kürzlich publizierten Arbeiten wurde ähnliches festgestellt^[3, 118]. Dort zeigte sich, dass eine zweizählige Salzbrücke zu Arg286 nicht vorteilhaft für die Bindungsaffinität war, da sie nicht in einer tief vergrabenen sondern in einer Lösungsmittel-exponierten Bindetasche ausgebildet wird. Das gleiche gilt hier für die beiden von dem Psicofuranosebaustein eingegangenen H-Brücken, auch sie verbleiben stark der Lösungsmittelumgebung exponiert.

Wie bei **6.3** ist das vermessene Wärmesignal bei der Titration von **6.1** und **6.2** in das Protein pufferabhängig (**Abbildung 6.7a**). Dies ist auf einen Wechsel der Protonierung am Stickstoff N(5) des *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst während der Ligandbindung zurückzuführen^[118].

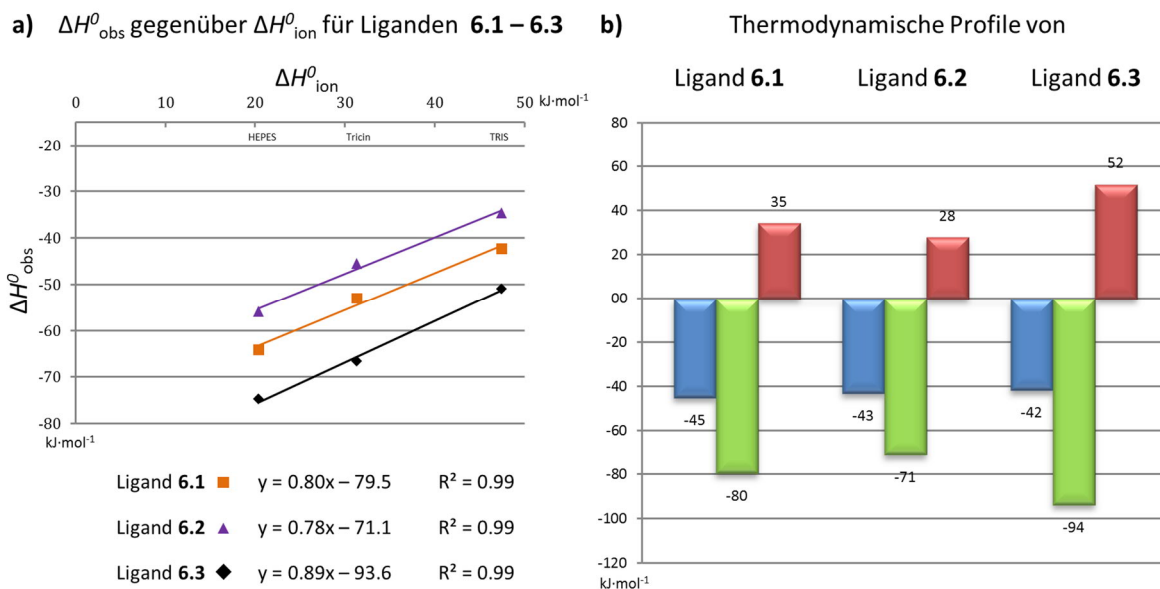


Abbildung 6.7. Diagramm ΔH_{obs}^0 gegen ΔH_{ion}^0 und thermodynamische Profile. **a)** Gemessene Enthalpien (ΔH_{obs}^0) der Liganden, aufgetragen gegen die Ionisationsenthalpie (ΔH_{ion}^0) der jeweiligen Puffer (HEPES, Tricin, TRIS), um die hinsichtlich der Ionisierungsenthalpie der verwendeten Puffer korrigierten Enthalpien der Bindung (ΔH_{bind}^0) zu erhalten. **6.1** orange, **6.2** violett und **6.3** schwarz. **b)** Thermodynamische Profile von **6.1** – **6.3**. ΔG^0 blau und korrigierte Werte für ΔH_{bind}^0 grün bzw. $-T\Delta S^0$ rot in kJ·mol⁻¹. **6.3** wurde bereits in einer vorangegangenen Arbeit bestimmt^[118].

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguaninen

Die hinsichtlich der Ionisationsenthalpie korrigierten thermodynamischen Parameter zeigen, dass die Bindung von **6.1** deutlich enthalpischer verläuft als die von **6.2**, bei annähernd gleichen ΔG^0 -Werten, was mit einer entropisch günstigeren Bindung von **6.2** einhergeht. Der Vergleich mit dem *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst **6.3** zeigt jedoch, dass die Adressierung der Ribose-33-Tasche durch Substituenten von **6.1** und **6.2** sowohl den enthalpischen Beitrag deutlich reduziert (**6.3**→**6.1** $\Delta\Delta H^0 = 14.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; **6.3**→**6.2** $\Delta\Delta H^0 = 22.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), als auch den entropischen Beitrag signifikant erhöht (**6.3**→**6.1** $-\Delta\Delta S^0 = -17.5 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; **6.3**→**6.2** $-\Delta\Delta S^0 = -23.1 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$), allerdings durch kompensatorische Effekte die Bindungsaffinität kaum beeinflusst wird (**6.3**→**6.1** $\Delta\Delta G^0 = 3.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$; **6.3**→**6.2** $\Delta\Delta G^0 = 1.4 \text{ kJ}\cdot\text{mol}^{-1}$). Vermutlich ist der Preis für die Desolvatation von **6.1** und **6.2** größer als bei **6.3** und bedingt eine weniger exotherme Bindung dieser Liganden an das Protein. Andererseits ersetzen die beiden Psicofuranosen zwei Wassermoleküle (**W₇** und **W₈**), die in TGT-**6.3**_{SOAK}^{C2} zusätzlich zu finden sind. Dies könnte den entropischen Vorteil von **6.1** und **6.2** gegenüber **6.3** bei der Bindung erklären. Detaillierte Angaben zu ITC-Messungen können **Kapitel 11** dieser Arbeit entnommen werden.

6.4 Zusammenfassung

Im vorliegenden Kapitel wurde die Etablierung von Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguaninen, die die Ribose-33-Tasche der TGT adressieren, beschrieben. Zwei von sechs Verbindungen wurden sowohl röntgenkristallographisch, als auch thermodynamisch mittels ITC Messungen, charakterisiert. Die Verbindungen **6.1** und **6.2** sind Teil einer Ligandenserie von sechs Derivaten. Vier weitere Derivate werden zurzeit synthetisiert, aufgereinigt und in naher Zukunft ausführlich untersucht.

Die angefügten Monosaccharide an C(2) des trizyklischen Grundgerüsts liegen bei beiden untersuchten Verbindungen zu 100% besetzt in der Ribose-33-Tasche vor. Wie in vorangegangenen Studien beschrieben, ist auch eine gewisse Restmobilität der Substituenten von **6.1** und **6.2** nachweisbar. Dies ist anhand von leicht erhöhten *B*-Faktoren der C(2)-Substituenten zu beobachten.

Während, wie in **Kapitel 2** beschrieben, die C(4)-Furanosyl-Substituenten an der Position der Phosphatgruppe-35 des natürlichen tRNA Substrats binden, können hingegen bei den C(2)-Psicofuranosen von **6.1** und **6.2** die Monosaccharide nicht mit der Phosphatgruppe-34 zur Deckung gebracht werden. In beiden Kokristallstrukturen TGT-**6.1**_{CO}^{C2} und TGT-**6.2**_{CO}^{C2} ist eine weitgehend unveränderte, geordnete Wasserstruktur in der Ribose-33-Tasche zu erkennen, so dass trotz unterschiedlichen Bindungsmodi der Substituenten annähernd die gleiche Wasserstruktur nachzuweisen ist, wie sie in der Kristallstruktur des unsubstituierten *lin*-Benzoguanin **6.3** zu finden ist (**Abbildung 6.5**).

6. Adressierung der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Tasche mit Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguaninen

Durch die Monosaccharid-Substituenten von **6.1** und **6.2** werden allerdings zwei Wassermoleküle im Vergleich zu TGT-**6.3**_{SOAK}^{C2}, bzw. drei im Vergleich zur apo-TGT Struktur verdrängt.

Die Enthalpie- und Entropieterme von **6.1** und **6.2** zeigen ein vergleichbares Aufspaltungsmuster (**Abbildung 6.7b**). Bei dem unsubstituierten *lin*-Benzoguanin **6.3** ist die Aufspaltung der Enthalpie- und Entropieterme allerdings größer, d.h. die Enthalpie-Entropie Kompensation erfährt hier ein stärkeres Ausmaß. Trotz annähernd gleichen Affinitäten und ähnlichen thermodynamischen Signaturen, binden die Monosaccharid-Substituenten mit stark unterschiedlichen Orientierungen in der Lösungsmittel-exponierten Ribose-33-Bindetasche. Die zusätzlichen direkten H-Brücken des Substituenten von **6.2** zu Tyr106 und Arg286 führen zu keinem Affinitätsgewinn. Im Vergleich zu dem unsubstituierten Grundgerüst **6.3** wurde allerdings bei **6.1** eine um den Faktor 3.7 und bei **6.2** eine um den Faktor 1.6 verbesserte Bindungsaffinität erhalten.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

7.1 Vorwort

Die in diesem Kapitel neu präsentierten Liganden **7.1 – 7.3** wurden in Kooperation mit Dr. Toni Pfaffender entwickelt und von diesem, zusammen mit Jorna Kalim, synthetisiert und aufgereinigt (Arbeitsgruppe Prof. Dr. François Diederich, ETH Zürich, Schweiz). Native nanoESI-MS Messungen wurden von Thomas Botzanowski durchgeführt (LSMBO, Dr. Sarah Cianférani, Straßburg, Frankreich). Die Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT, ITC Titrations, kinetischen Radioaktivmessungen und röntgenkristallographischen Untersuchungen wurden vom Autor der vorliegenden Arbeit durchgeführt.

7.2 Einleitung

Für die katalytische Aktivität der bakteriellen TGT ist deren Dimerisierung essentiell^[15-17]. In diesem dimeren Zusammenschluss stabilisiert ein TGT-Monomer über den β E β F-Loop das tRNA Substrat, während das zweite TGT-Monomer den Basenaustausch in der Guanin-34/preQ₁-Bindetasche katalysiert (**Abbildung 1.5. & 1.7**). Während Ribose-33 und Uracil-33 der tRNA in einer flachen Lösungsmittel-exponierten Tasche vorliegen, binden Ribose-34 und Phosphat-35 in der tief vergrabenen Ribose-34-Tasche^[16]. Alle bisher entwickelten hochaffinen TGT Inhibitoren binden in der Guanin-34/preQ₁-Tasche und können über Substituenten die genannten benachbarten Subtaschen (Ribose-33- und Ribose-34-Tasche) adressieren^[1, 3, 13-15, 27, 114-116, 118, 119]. In **Kapitel 3** wurde anhand von C(4)-substituierten *lin*-Benzoguaninen gezeigt, dass die Adressierung des hydrophoben Bereichs (Val282, Leu68, Val45) innerhalb der Ribose-34-Tasche mit der strukturellen Auflösung des *Loop-Helix Motivs* (*Loop* β 1 α 1 = Thr47 – Lys55 und *Helix* α 1 = Pro56 – Ala61) verbunden ist, der sich in unmittelbarer Nachbarschaft zu dieser Tasche befindet. Die Funktion dieses Motivs ist mit der Abschirmung von Wassermolekülen aus einem, durch vier aromatischen Aminosäuren (Trp326, Tyr330, His333 und Phe92'; **Abbildung 3.2**) gebildeten *Hotspot* des *Dimer-Interfaces* (Protein-Protein-Kontaktfläche der zwei TGT-Monomere) verknüpft^[25, 26]. Es zeigte sich, dass der Zusammenbruch des *Loop-Helix Motivs* und damit der Verlust der geometrischen Integrität dieses Strukturelements mit dem Eindringen von Wassermolekülen in die *Hotspot* Region des *Dimer-Interfaces* einhergeht.

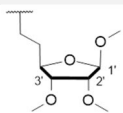
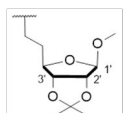
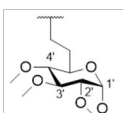
NanoESI-MS Messungen bestätigten, dass die Destabilisierung dieses Motivs mit der Erhöhung der Monomerkonzentration verbunden ist und demnach mit einer Störung der TGT-Dimerisierung zusammenhängt (**Kapitel 3**). Aufgrund der Erkenntnis, dass eine Destabilisierung des *Loop-Helix Motivs* durch Adressierung des hydrophoben Bereichs der Ribose-34-Tasche ausgelöst werden kann, wurden drei Monosaccharid-basierte Verbindungen entwickelt (**7.1 – 7.3; Tabelle 7.1**), die in dem genannten Bereich binden sollen. Die ersten beiden Verbindungen (**7.1 – 7.2**) beruhen auf dem Furanose-basierten *lin*-Benzoguanin **2.6c** aus **Kapitel 2** (bzw. in **Kapitel 3** ist dieser Ligand als **3.3** aufgeführt), der durch seine 3'-O-Methylgruppe (3'-OMe Gruppe) keine Wasserstoffbrücke (H-Brücke) zu Asp280 ausbilden kann und dadurch tiefer in die Ribose-34-Tasche eindringt (**Abbildung 7.1a**)^[1]. Dabei verdrängt die 3'-OMe Gruppe die Seitenkette von Leu68, welche wiederum die Seitenkette von Val45 räumlich verschiebt und dadurch das *Loop-Helix Motiv* destabilisiert. Im Vergleich zu dieser Verbindung ist **7.1 (Tabelle 7.1)** zusätzlich an der 2'-Hydroxylgruppe (2'-OH) der Furanose methyliert, wohingegen **7.2** durch Verknüpfung über eine Methylenbrücke an der 2'- und 3'-Sauerstofffunktion einen zusätzlichen Zyklus erhält.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Der C(4)-Substituent von **7.3** basiert auf einem Pyranose-Zucker (Galaktose), jedoch zeichnet er sich wie **7.1** durch die vollständige Methylierung aller Hydroxylgruppen aus. Die drei neuen Verbindungen (**7.1** – **7.3**) wurden sowohl röntgenkristallographisch, als auch mit dem Radioaktivassay und mittels nativen nanoESI-MS Messungen untersucht. Die Bestimmung ihrer thermodynamischen Profile durch die ITC (Isothermale Titrationskalorimetrie) ist ebenfalls Teil der vorliegenden Arbeit.

7.3 Ergebnisse und Diskussion

Tabelle 7.1. Chemische Formel, Kokristallstrukturen, Bindungsaffinitäten und gemessene Monomeranteile.

Ligand	Kokristallstrukturen			$K_i^{[b]}$ [nM]	Monomer ^[c] [%]	Relativer Monomer Anteil ^[d]
	Komplex ^[a]	Auflösung [Å]	PDB ID			
7.1 	TGT· 7.1 _{CO} ^{C2}	1.42	5LPO	243 ± 14	12.3	3.6
	TGT· 7.2 _{CO} ^{C2}	1.99	5LPP	544 ± 174	6.0	1.8
7.2 	TGT· 7.2 _{CO} ^{P21}	2.52	5LPQ			
	TGT· 7.3 _{CO} ^{C2}	1.27	5LPS	237 ± 41	10.3	3.0
7.3 	TGT· 7.3 _{CO} ^{P21}	2.36	5LPT			

[a] TGT·Ligand_{Protokol} Raumgruppe der Kokristallstruktur. CO = Kristalle durch Kokristallisation erhalten. [b] Die angegebenen Fehler sind Standardabweichungen aus mindestens drei Messungen. [c] Prozentualer Monomeranteil bestimmt durch native nanoESI-MS Messungen. [d] Auf apo-Protein Bedingungen normalisierter Monomeranteil.

7.3.1 Bindungsmodi und strukturelle Unterschiede in den Kokristallstrukturen der Monosaccharid-basierten *lin*-Benzoguanine **7.1** – **7.3**

Von **7.1** – **7.3** wurden insgesamt fünf Kokristallstrukturen mit dem *Z. mobilis* TGT-Enzym zwischen 1.42 Å und 2.52 Å aufgezeichnet. Alle Kokristallstrukturen zeigen die Liganden mit einer komplett definierten und gut aufgelösten Differenzelektronendichte, wobei nur in den Komplexen TGT·**7.2**_{CO}^{C2} und TGT·**7.3**_{CO}^{C2} einzelne Atome des C(4)-Substituenten nicht eindeutig der Differenzelektronendichte zuzuweisen sind.

In den fünf Kokristallstrukturen bildet das gemeinsame trizyklische *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst von **7.1** – **7.3** jeweils acht H-Brücken zu den Seitenketten von Asp102, Asp156, Gln203, dem Amidstickstoff von Gly230 und den Carbonylgruppen von Ala232 und Leu231 aus (**Abbildung 7.1a**, **7.2a,b** & **7.3a,b**). Darüber hinaus interagiert der Trizyklus in der Guanin-34/preQ₁-Bindetasche zwischen Tyr106 und Met260 und erfährt dort vorteilhafte π - π Wechselwirkungen.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Ligand **7.1**, der sich von **2.6c** (**Kapitel 2**; bzw. in **Kapitel 3** ist dieser Ligand als **3.3** aufgeführt) nur durch eine zusätzliche Methylgruppe an Position 2'-OH des Furanosylrings unterscheidet, bindet nahezu identisch im Protein in der Kokristallstruktur (TGT·**7.1**_{CO}^{C2}; **Abbildung 7.1a**)^[1]. Durch die 2'-OMe Gruppe von **7.1** wird allerdings ein Wassermolekül in unmittelbarer Nähe, das noch in der Kokristallstruktur des unmethylierten Derivats (TGT·**2.6c**_{CO}^{C2} aus **Kapitel 2**; PDB ID: 4KWO; in **Kapitel 3** wird die Struktur unter TGT·**3.3**_{CO}^{C2} aufgeführt) detektiert wurde, verdrängt.

Der nahezu identische Bindungsmodus von **7.1** und **2.6c** (aus **Kapitel 2**) geht einher mit gleichen Interaktionen zu den verbleibenden umliegenden Wassermolekülen und Reorientierungen der hydrophoben Reste Val282, Leu68 und Val45, als auch der Neuausrichtung der sekundären Strukturelemente des *Loop-Helix Motivs* und der damit verbundenen Destabilisierung des Homodimer-Interfaces (**Abbildung 7.1**).

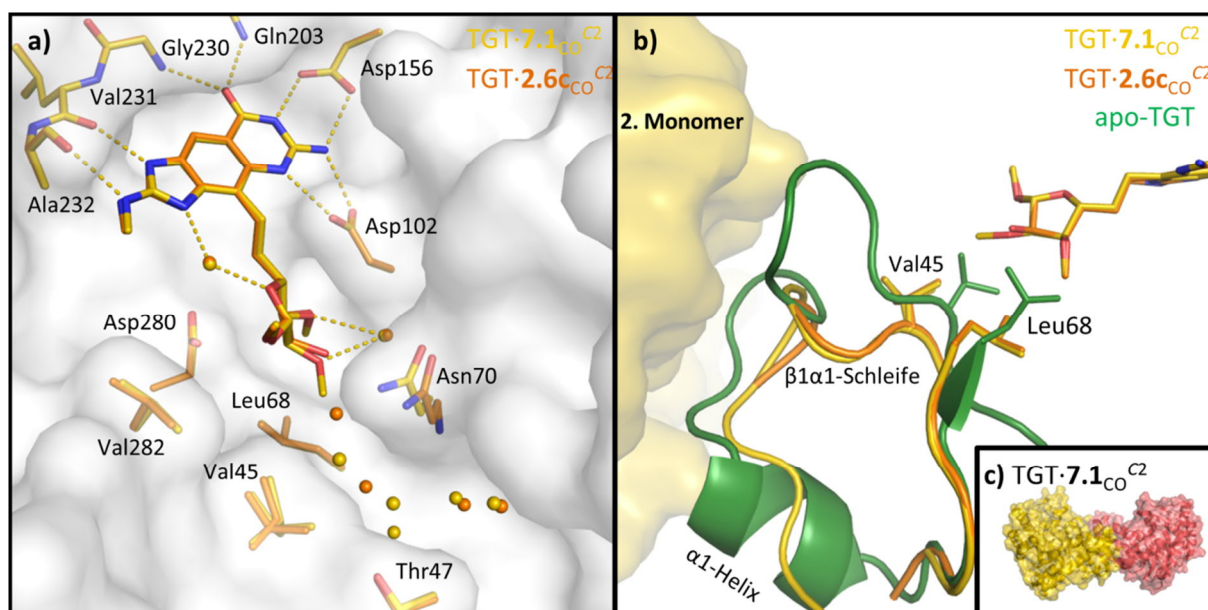


Abbildung 7.1. Überlagerung der Kokristallstrukturen **a)** TGT·**7.1**_{CO}^{C2} (Kohlenstoff und Wassermoleküle gelb, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau) und TGT·**2.6c**_{CO}^{C2} (**Kapitel 2**; PDB ID: 4KWO, Kohlenstoff und Wassermoleküle orange^[1]). **b)** Die gleiche Überlagerung aus einer anderen Blickrichtung zur Darstellung des Einflusses des Liganden auf das *Loop-Helix Motiv*. Das zweite TGT-Monomer ist als gelbe Oberfläche dargestellt. Apo-TGT ist grün gefärbt (PDB ID: 1POD^[86]). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau; H-Brücken der Liganden sind als gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.7 und 3.0 Å). Met260 und Tyr106 sind zur besseren Übersicht nicht dargestellt. **c)** Konventionelles Dimer aus zwei TGT-Monomeren (rot und gelb) in TGT·**7.1**_{CO}^{C2}.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Von **7.2** wurden zwei Kokristallstrukturen mit dem TGT-Enzym in zwei unterschiedlichen Raumgruppen und Protein-Packungen aufgenommen (TGT·**7.2**_{co}^{C2} und TGT·**7.2**_{co}^{P21}). In beiden Kokristallstrukturen kann eindeutige Differenzelektronendichte für das trizyklische Grundgerüst zu beobachten. In TGT·**7.2**_{co}^{C2} ist die Differenzelektronendichte für das an C(4) angefügte Furanose-Derivat jedoch etwas schwächer aufgelöst (**Abbildung 7.2a**). Für die 1'-OMe Gruppe, als auch für die zwei tetraedrisch angeordneten Methylgruppen an dem verbindenden Kohlenstoff zwischen 2'-O und 3'-O, ist keine eindeutige Differenzelektronendichte festzustellen.

Dies deutet auf eine Restbeweglichkeit des C(4)-Substituenten in der Bindetasche hin. Trotzdem bildet der Sauerstoff der 2'-OMe Gruppe eine H-Brücke zu einem in 3.0 Å entfernten Wassermolekül aus, welches weiterhin die Carboxylgruppe von Asp280 solvatisiert. Bei der Adressierung der Ribose-34-Tasche durch den C(4)-Substituenten treten, wie auch in TGT·**7.1**_{co}^{C2}, Umorientierungen der hydrophoben Reste Val282, Leu68 und Val45 in der Kokristallstruktur auf. Der β 1 α 1-Loop bricht zusammen und es können, wie auch bei TGT·**7.1**_{co}^{C2}, rund um die ursprüngliche Position von Thr47 (Teil des β 1 α 1-Loops) Wassermoleküle in der Kokristallstruktur festgestellt werden.

In TGT·**7.2**_{co}^{P21} liegen zwei TGT-Monomere (Kette A und B) in der asymmetrischen Einheit vor. In beiden TGT-Monomeren ist der Bindungsmodus des Liganden identisch (**Abbildung 7.2b** zeigt Kette A). Wie bei Ligand **3.9** (**Kapitel 3**), der durch Kokristallisation mit *Z. mobilis* TGT ausschließlich in der Raumgruppe $P2_1$ kristallisiert (TGT·**3.9**_{co}^{P21}, **Kapitel 3**; PDB ID: 5I07), sind die zwei TGT-Monomere des Homodimers in TGT·**7.2**_{co}^{P21} ebenfalls neu ausgerichtet und es bildet sich das *verdrehte* Dimer aus (**Abbildung 7.2e**). Obwohl der Bindungsmodus von **7.2** in den TGT-Monomeren der Dimerpackung von TGT·**7.2**_{co}^{P21} identisch auftritt, ist die Orientierung des C(4)-Substituenten deutlich unterschiedlich ausgerichtet in der korrespondierenden TGT·**7.2**_{co}^{C2}-Struktur. Trotz geringerer Auflösung von TGT·**7.2**_{co}^{P21} (2.52 Å) im Vergleich zu TGT·**7.2**_{co}^{C2} (1.99 Å), ist der Furanose-Substituent komplett und eindeutig durch Differenzelektronendichte definiert. Im Gegensatz zum Bindungsmodus in TGT·**7.2**_{co}^{C2}, ragt in TGT·**7.2**_{co}^{P21} die 1'-OMe Gruppe in Richtung des hydrophoben Restes Leu68. Dies hat zur Folge, dass sich sowohl Leu68, als auch die Reste Val282, Val45 und das ganze *Loop-Helix Motiv* umorientieren. In der Konformation des Furanose-Derivats in TGT·**7.2**_{co}^{P21} ragen nun die terminalen Methylgruppen an der verknüpfenden Methylenbrücke zwischen 2'-O und 3'-O in Richtung auf Glu399' des zweiten TGT-Monomers (**Abbildung 7.2c**). Wie auch bei der in **Kapitel 3** beschriebenen Kokristallstruktur in der Raumgruppe $P2_1$ (TGT·**3.9**_{co}^{P21}; PDB ID: 5I07), nimmt der β 1 α 1-Loop in TGT·**7.2**_{co}^{P21} eine Orientierung in Richtung des ursprünglichen aromatischen *Hotspots* des Dimer-Interfaces ein und verhindert so die Ausbildung des konventionellen Dimers (funktionales TGT Dimer, aufzufinden in Kristallstrukturen in der Raumgruppe $C2$; **Abbildung 7.2c-e**).

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

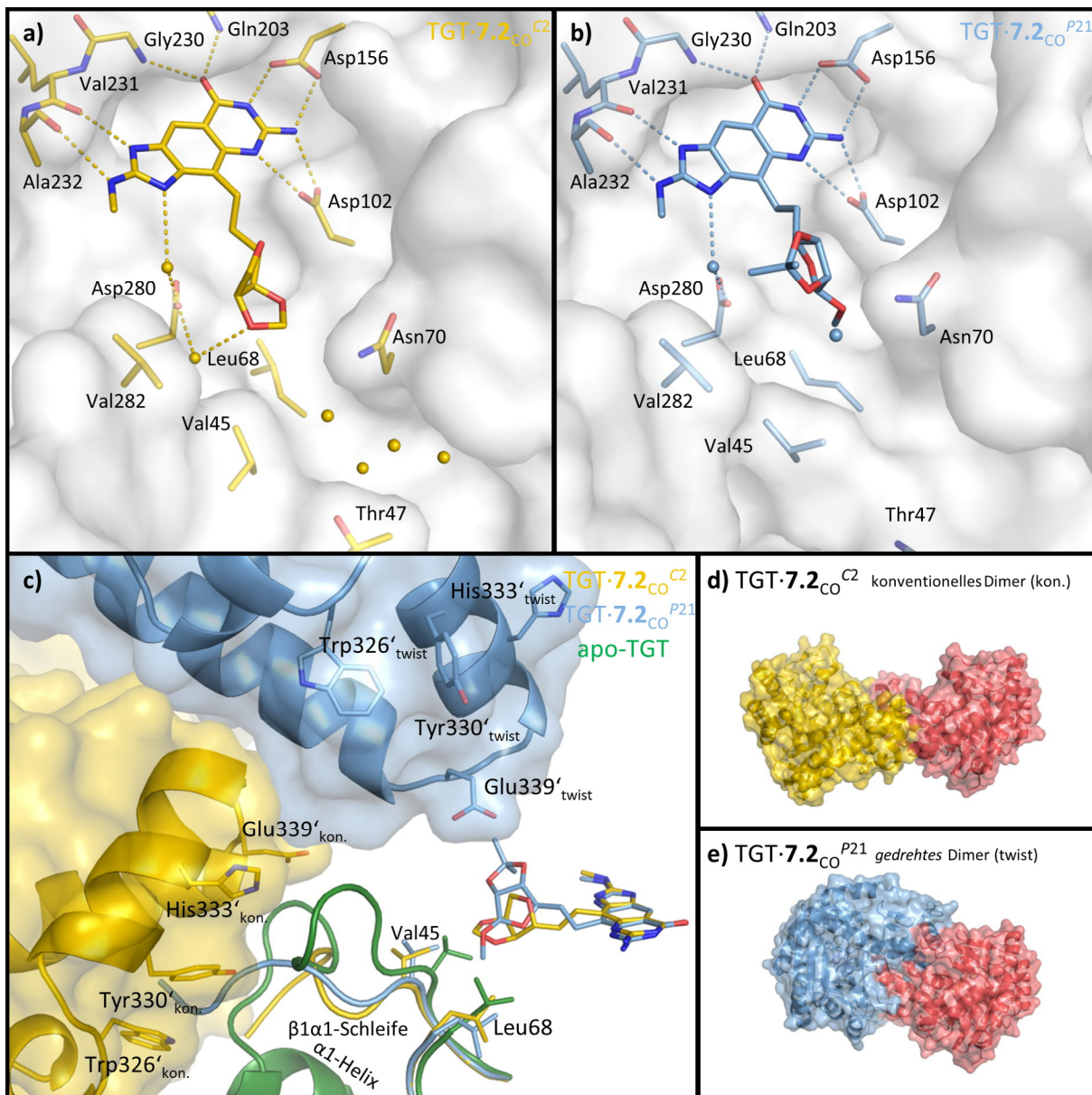


Abbildung 7.2. Bindungsmodus von **7.2 a)** in $\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{C}2}$ (Kohlenstoff und Wassermoleküle gelb, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau) und **b)** in $\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{P}21}$ (Kohlenstoff und Wassermoleküle hellblau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau). **c)** Überlagerung von $\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{C}2}$ und $\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{P}21}$ zur Darstellung des Einflusses auf das *Loop-Helix Motiv*. Das zweite TGT-Monomer ist in gelb ($\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{C}2}$), bzw. hellblau ($\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{P}21}$) eingefärbt. Apo-TGT ist grün gefärbt (PDB ID: 1POD^[86]). **d)** Konventionelles Dimer aus zwei TGT-Monomeren (rot und gelb) in $\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{C}2}$. **e)** Verdrehtes Dimer aus zwei TGT-Monomeren (rot und blau) in $\text{TGT} \cdot 7.2_{\text{CO}}^{\text{P}21}$. Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau; H-Brücken des Liganden sind als gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.7 und 3.0 Å). Met260 und Tyr106 sind zur besseren Übersicht weggelassen.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Von **7.3** wurde ebenfalls, wie auch von **7.2**, sowohl eine Kokristallstruktur der Raumgruppe $C2$ (TGT·**7.3**_{co}^{C2}), als auch eine der Raumgruppe $P2_1$ (TGT·**7.3**_{co}^{P21}), bestimmt. In TGT·**7.3**_{co}^{C2} ist, wie auch in TGT·**7.2**_{co}^{C2}, eine erhöhte Restflexibilität des C(4)-Substituenten des *lin*-Benzoguanins in der Ribose-34-Tasche festzustellen (**Abbildung 7.3a**). Dies zeichnet sich sowohl durch fehlende Differenzelektronendichte der 2'-OMe Gruppe, als auch durch eine mit 42% besetzten alternativen Konformation des ganzen C(4)-Substituenten, aus (Konformation A: 58%; Konformation B: 42%). Wie auch bei den beiden zuvor beschriebenen Liganden (**7.1** und **7.2**), führen die vorgefundenen Bindungsmodi des Monosaccharids von **7.3** zu einer Umlagerung der hydrophoben Reste Val282, Leu68 und Val45, ausgelöst durch sterisch anspruchsvolle Wechselwirkungen mit Leu68. Die damit verbundene strukturelle Neuausrichtung des *Loop-Helix Motifs* führt ebenso in TGT·**7.3**_{co}^{C2} zum Eindringen von Wassermolekülen in den frei gewordenen Platz des $\beta 1\alpha 1$ -Loops (**Abbildung 7.3a**). Interessanterweise kann, neben der Restbeweglichkeit des Monosaccharid-Substituenten, weder Asp280 noch Asp102 eine finale Konformation einnehmen. Beide Aspartate liegen jeweils in zwei Konformationen vor (Konformation A: 60% (Asp280), 72% (Asp102); Konformation B: 40% (Asp280), 28% (Asp102)). Das gleiche gilt auch für Asn70 (Konformation A: 58%; Konformation B: 42%).

Die zuletzt genannte Aminosäure ist Teil des Bodens der Ribose-34-Tasche, die infolge der Ligandbindung wie bei fast allen an C(4) substituierten *lin*-Benzoguaninen etwas aus ihrer ursprünglichen Position im apo-Protein gedrängt wird. Im Gegensatz zu den eben genannten Aspartaten Asp280 und Asp102 ist allerdings Konformation A der Asparagin-Seitenkette (Asn70) nicht kompatibel mit Konformation B des C(4)-Substituenten des Liganden (**Abbildung 7.3a**).

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

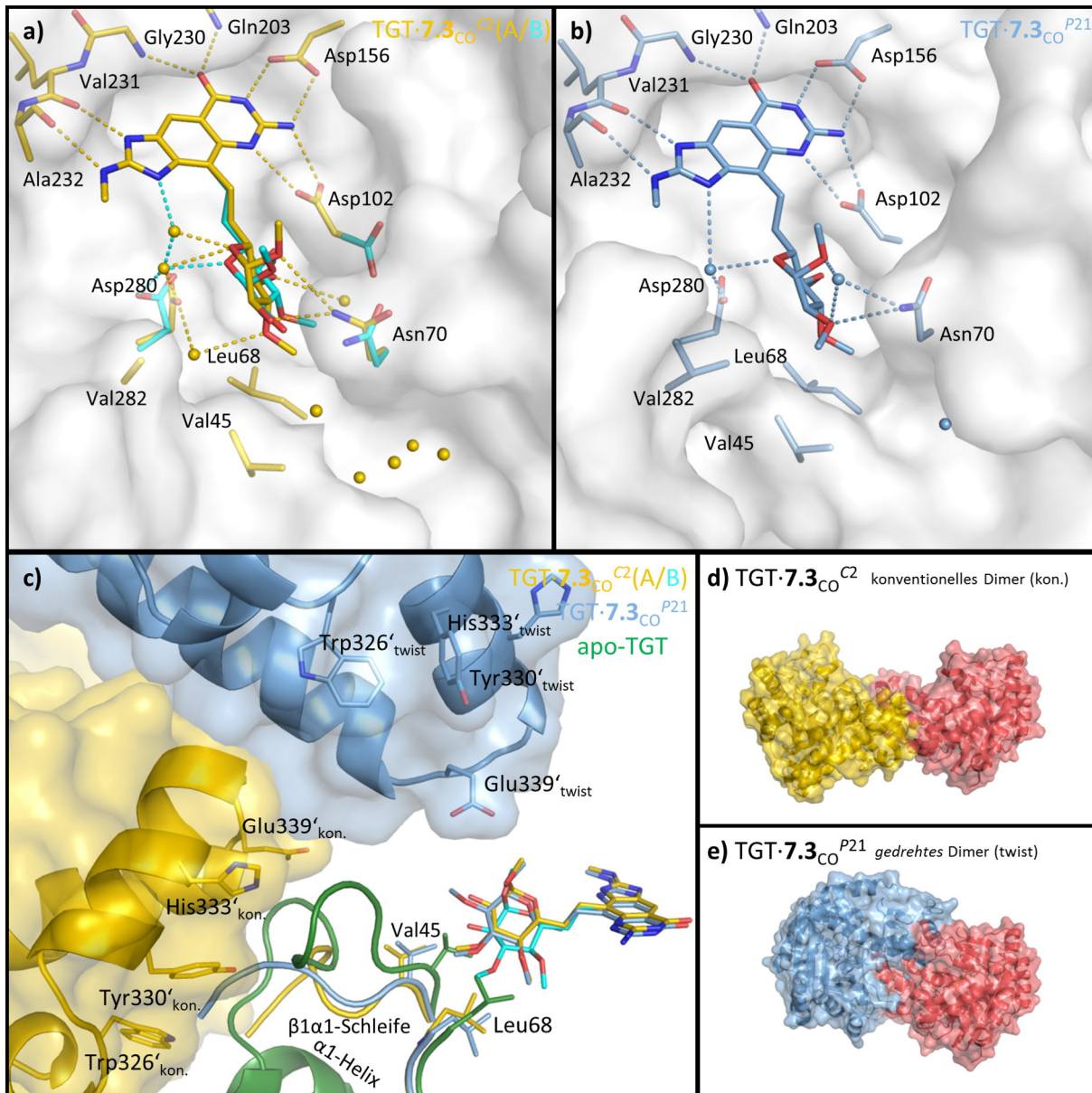


Abbildung 7.3. Bindungsmodus von **7.3** **a)** in TGT-7.3_{CO}^{C2} (Kohlenstoff und Wassermoleküle gelb, alternative Konformationen cyan, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau) und **b)** in TGT-7.3_{CO}^{P21} (Kohlenstoff und Wassermoleküle hellblau, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau). **c)** Überlagerung von TGT-7.3_{CO}^{C2} und TGT-7.3_{CO}^{P21} zur Darstellung des Einflusses auf das Loop-Helix Motiv. Das zweite TGT-Monomer ist in gelb (TGT-7.3_{CO}^{C2}), bzw. hellblau (TGT-7.3_{CO}^{P21}) eingefärbt. Apo-TGT ist grün gefärbt (PDB ID: 1POD^[86]). **d)** Konventionelles Dimer aus zwei TGT-Monomeren (rot und gelb) in TGT-7.3_{CO}^{C2}. **e)** Verdrehtes Dimer aus zwei TGT-Monomeren (rot und blau) in TGT-7.3_{CO}^{P21}. Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau, H-Brücken des Liganden sind als gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.7 und 3.6 Å). Met260 und Tyr106 sind zur besseren Übersicht weggelassen.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Die in der finalen Kokristallstruktur nicht zugewiesene 2'-OMe Gruppe würde der Konformation A der Seitenkette von Asn70 zu nahe kommen (ca. 1.4 Å). Auch ein teilbesetztes Wassermolekül (58%) in unmittelbarer Nähe ist nicht vereinbar mit Konformation B des Monosaccharid-Substituenten (42%; Abstand ca. 1.7 Å).

In TGT·7.3_{CO}^{P21} liegt der Monosaccharid-Substituent von 7.3 in beiden TGT-Monomeren (Kette A und B) des in dieser Struktur vorgefundenen *verdrehten* Dimers in einer eindeutig zuweisbaren Konformation vor. Wie in TGT·7.2_{CO}^{P21}, ist auch in TGT·7.3_{CO}^{P21} der Ligand komplett durch Differenzelektronendichte definiert (**Abbildung 7.3b** zeigt Kette A). Der Bindungsmodus des C(4)-Substituenten in TGT·7.3_{CO}^{P21} gleicht dem Bindungsmodus der höher populierte Konformation A aus TGT·7.3_{CO}^{C2}. Asp102 und Asp280 nehmen ebenfalls die in TGT·7.3_{CO}^{C2} höher besetzte Konformation ein. Die vorgefundene Ausrichtung von Asn70 in TGT·7.3_{CO}^{P21} ist mit keinen der beiden in TGT·7.3_{CO}^{C2} beobachteten Konformationen identisch. Für das beschriebene teilbesetzte Wassermolekül aus TGT·7.3_{CO}^{C2} konnte jedoch in der P2₁-Struktur keine Elektronendichte detektiert werden. Der endozyklische Ether-Sauerstoff der Pyranose interagiert wiederum wie in TGT·7.3_{CO}^{C2} mit einem Wassermolekül, welches Asp280 solvatisiert und eine weitere H-Brücke zu dem Stickstoff N(3) des Grundgerüsts von 7.3 ausbildet.

7.3.2 Einflüsse der Ligandbindung von 7.1 – 7.3 auf den Dimer-Interface Hotspot und die Zink-Subdomäne der TGT

Das konventionelle *Interface* des TGT Homodimers, wie es in allen Kristallstrukturen der Raumgruppe C2 vorkommt, zeichnet sich durch eine zweizählige Drehachse aus. Die Kristallstrukturen mit der Raumgruppe I4 der TGT im gebundenen Zustand mit dem *Stem/loop* Abschnitt der tRNA (PDB IDs: 1Q2S, 1Q2R^[16]) zeigen, dass die Packung als Homodimer mit weitgehend analoger Packung wie in den C2 symmetrischen Strukturen bestehen bleibt, wenn das tRNA Substrat an das TGT Homodimer bindet (**Abbildung 1.7**). Daher kommen Strukturelemente, wie der aromatische *Hotspot*^[25, 26], der β1α1-Loop, wie auch die Zink-Subdomäne in dem Dimer *Interface* zweimal vor (**Abbildung 7.4a**). Die Zink-Subdomäne befindet sich in unmittelbarer Nähe zum aromatischen *Hotspot* und dem β1α1-Loop (**Abbildung 7.4b**). Das erstgenannte Strukturelement trägt höchstwahrscheinlich durch feste Koordination des Zinks wesentlich zur Rigidität von Proteinen bei^[183].

In den bisher in der *protein data bank* (PDB, www.rcsb.org) deponierten *Z. mobilis* TGT Kristallstrukturen ist die Zink-Subdomäne hochkonserviert. Die Subdomäne wird auch nicht beeinträchtigt, wenn Liganden das *Loop-Helix Motiv* durch ihre an C(4) angefügten Substituenten destabilisieren (**Abbildung 7.4c**).

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

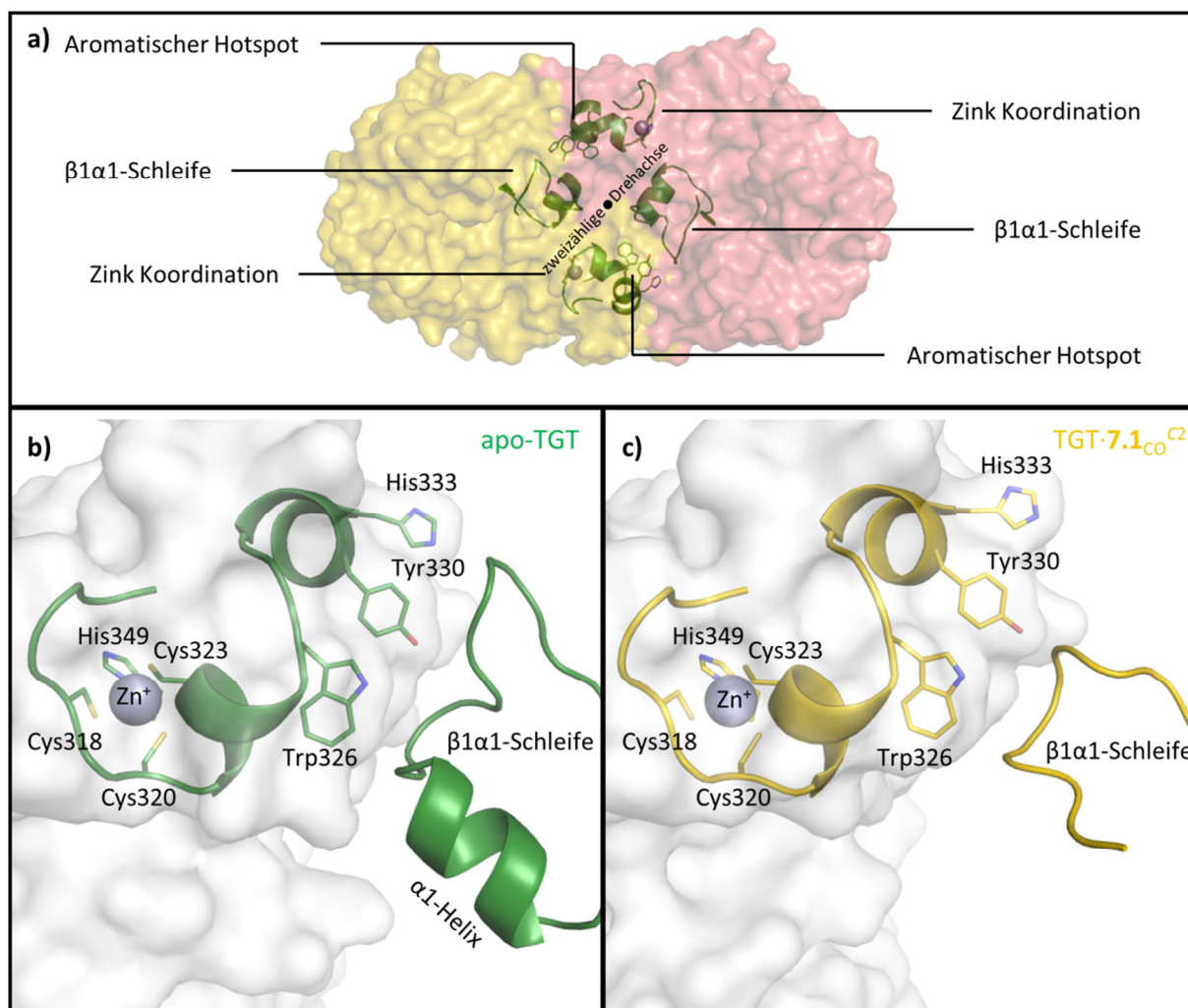


Abbildung 7.4. a) Überblick über das konventionelle Dimer und dessen essentielle Strukturelemente (apo-TGT, PDB ID: 1POD^[86]). Die Oberfläche der roten (TGT-Monomer 1) und gelben (TGT-Monomer 2) Monomereinheit bilden untereinander das *Interface* mit ihrer zweizähligen Drehachse. Strukturelemente wie der aromatische *Hotspot*, der β1α1-*Loop* und die Zink-Subdomäne sind als grüne Cartoons und Stäbchen dargestellt. b) Fokussierung auf eine der zwei Zentren der genannten Strukturelemente des apo-Proteins (Kohlenstoff grün, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau). c) TGT·7.1_{co}^{C2} (Kohlenstoff gelb, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb. Zn²⁺ ist als graue Kugel dargestellt.

Jedoch kann eine Beeinträchtigung der Zink-Subdomäne in den Kokristallstrukturen der Raumgruppe C2 von 7.2 und 7.3 (TGT·7.2_{co}^{C2} und TGT·7.3_{co}^{C2}) der vorliegenden Arbeit festgestellt werden. Zwar wird in TGT·7.2_{co}^{C2} das Zink nach wie vor von His349, Cys323, Cys320 und Cys318 koordiniert (**Abbildung 7.5a**), allerdings fehlt eindeutig zuweisbare Elektronendichte für die benachbarten Reste Ser316 und Glu317. Gleichzeitig konnte die Besetzung des Zinkions nur auf 44% verfeinert werden. Darüber hinaus ist die Elektronendichte der koordinierenden Reste des Zinks nur schwach ausgeprägt. Dies alles deutet darauf hin, dass die Zink-Koordination, so wie sie in der Kristallstruktur zu erkennen ist, nur zu etwa der Hälfte populierte in dieser Anordnung angetroffen wird (44%).

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

In TGT·**7.3**_{CO}^{C2} ließ sich die Besetzung des Zinks sogar nur zu 21% verfeinern. Zusätzlich ist der Sequenzabschnitt Glu317 bis Gln324 nicht durch eine eindeutige Differenzelektronendichte definiert und wurde daher nicht in der finalen Struktur modelliert (**Abbildung 7.5b**). Leu314 bis Ser316 liegen in Konformationen vor, die nicht kompatibel zu der Zink-Subdomäne sind und aus diesem Grund nur zu 79% Besetzung zu verfeinern waren.

In unmittelbarer Nähe zu der Zink-Subdomäne befinden sich drei der vier aromatischen Reste des aromatischen *Hotspots* (Trp326, Tyr330 und His333). Während diese drei Reste in allen bisher bekannten TGT Strukturen der Raumgruppe C2 und auch in TGT·**7.1**_{CO}^{C2} hochkonserviert vorliegen, ist in TGT·**7.2**_{CO}^{C2} und TGT·**7.3**_{CO}^{C2} der Indolring des Trp326 um 180° gedreht (**Abbildung 7.5a & b**). Dadurch ist es nicht mehr möglich eine H-Brücke zwischen dem Stickstoff des Indolrings und der Carbonylgruppe von Met93 auszubilden. Zuvor wurde gezeigt, dass diese Interaktion scheinbar wichtig für die Dimer-Stabilität ist^[26]. Das Umlappen des Indolrings von Trp326 wurde bisher nur in zwei mutierten Varianten der TGT beobachtet^[25]. Bei diesen TGT Varianten wurden innerhalb des aromatischen *Hotspots* essentielle Aminosäuren ausgetauscht (TGT(Tyr330Cys), PDB ID: 4HTB und TGT(His333Asp), PDB ID: 4L56^[25]). In nanoESI-MS Messungen dieser genannten TGT Varianten war damit eine Erhöhung des Monomeranteils und somit eine Destabilisierung des TGT Homodimers verbunden. Ein ähnliches Ausmaß an Destabilisierung des Homodimers konnte nun auch für die TGT, inkubiert mit **7.2** oder **7.3**, festgestellt werden (**Tabelle 7.1**).

In den Kokristallstrukturen der Raumgruppe P2₁, TGT·**7.2**_{CO}^{P21} und TGT·**7.3**_{CO}^{P21}, als auch in TGT·**3.9**_{CO}^{P21} (**Kapitel 3**; PDB ID: 5I07), tritt in dem dort vorliegenden *verdrehten* Dimer eine 180°-Drehung des Indolrings von Trp326 auf (**Abbildung 7.5c & d**). Im Vergleich zu den Kokristallstrukturen der Raumgruppe C2, TGT·**7.2**_{CO}^{C2} und TGT·**7.3**_{CO}^{C2}, ist die Zink-Koordination jedoch vollständig definiert und es ist keine verringerte Besetzung des Zinks nachzuweisen. Vor dem Hintergrund, dass die C(4)-Substituenten von **7.2** und **7.3** in den Kokristallstrukturen der Raumgruppe C2 erhöhte Flexibilitäten aufweisen, die Zink-Subdomäne beeinträchtigt wird und die Drehung des Indolrings von Trp326 ähnlich wie sie in den korrespondierenden Strukturen in Raumgruppe P2₁ vorliegt, lässt die Vermutung aufkommen, dass die Strukturen TGT·**7.2**_{CO}^{C2} und TGT·**7.3**_{CO}^{C2} als eine Art initialer Schritt zur Transformation in die neue *verdrehte* Dimerpackung, wie sie in TGT·**7.2**_{CO}^{P21} und TGT·**7.3**_{CO}^{P21} zu finden ist, anzusehen sind.

Verbindung **3.9** (**Kapitel 3**) kokristallisiert mit der TGT ausschließlich in der Raumgruppe P2₁. Da trotz *Seedings* mit Kristallen der Raumgruppe C2 ausschließlich Kokristalle von **3.9** (**Kapitel 3**) in der Raumgruppe P2₁ kristallisieren, kann man die Hypothese aufstellen, dass in Lösung ausschließlich (oder zumindest stark bevorzugt) das *verdrehte* Dimer vorliegt.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Im Gegensatz zu dieser Verbindung wurden von **7.2** und **7.3** sowohl Kokristalle des konventionellen Dimers (Raumgruppe $C2$), als auch des *verdrehten* Dimers (Raumgruppe $P2_1$), nebeneinander erhalten. Dies legt nahe, dass vermutlich ein Gleichgewicht zwischen dem *verdrehten* und dem konventionellen Dimer in Lösung besteht, wenn das Enzym mit dem jeweiligen Liganden bei hoher Konzentration vorliegt.

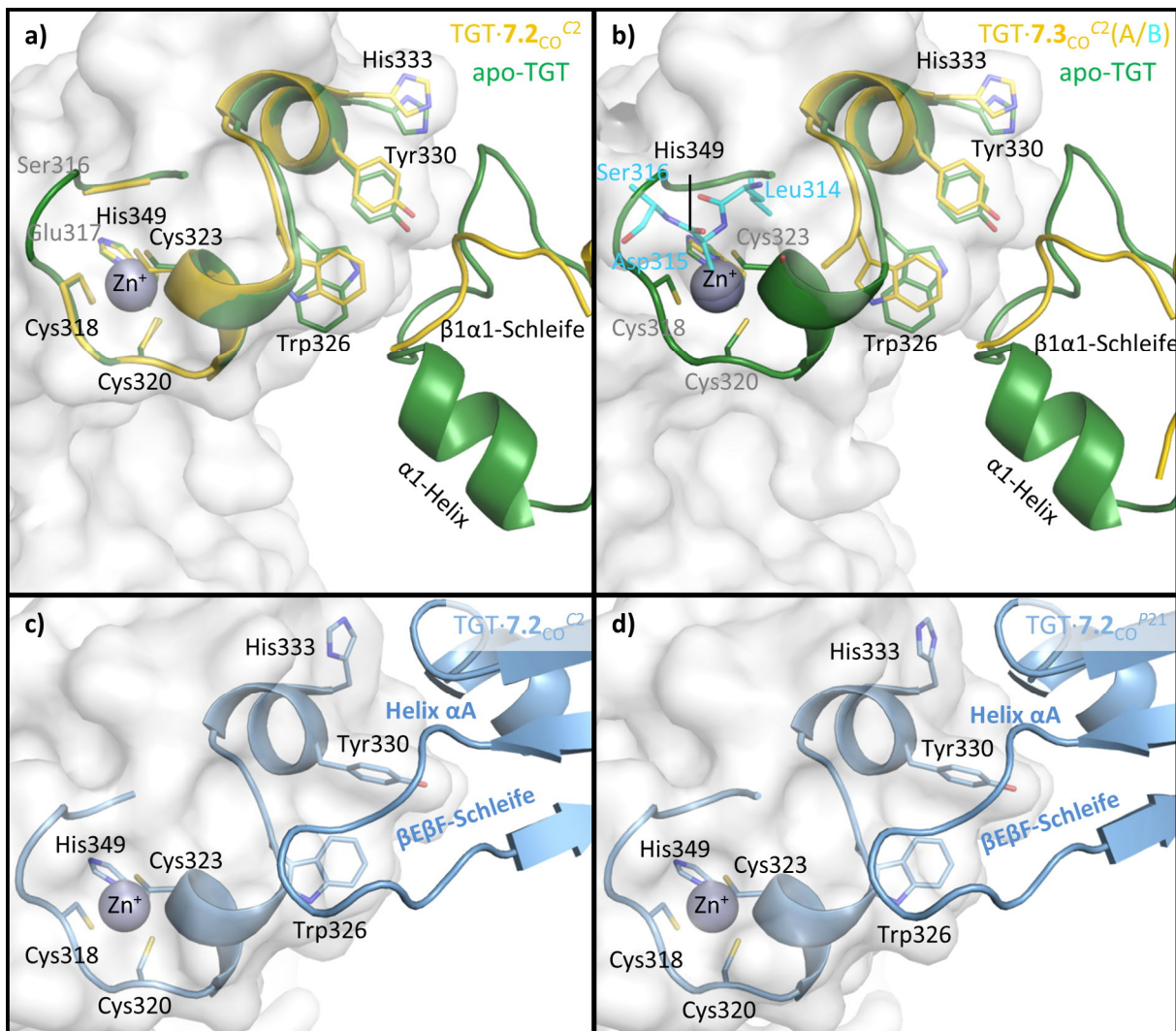


Abbildung 7.5. Fokus auf den aromatischen *Hotspot*, dem $\beta 1\alpha 1$ -Loop und der Zink-Subdomäne **a)** TGT·7.2_{co}^{C2} (Kohlenstoff gelb) und apo-TGT (Kohlenstoff grün, PDB ID: 1POD^[86]), **b)** TGT·7.3_{co}^{C2} (Kohlenstoff gelb und cyan) und apo-TGT, **c)** TGT·7.2_{co}^{P21} (Kohlenstoff hellblau), **d)** TGT·7.3_{co}^{P21} (Kohlenstoff hellblau). Farbcode: Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb. Zn⁺ ist als graue Kugel dargestellt. Lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau.

7.3.3 Bindungsaffinitäten, thermodynamische Signaturen und nanoESI-MS

Ergebnisse

Die in dem vorliegenden Kapitel neu vorgestellten Verbindungen (**7.1** – **7.3**) wurden durch den etablierten Radioaktivassay und nanoESI-MS Messungen charakterisiert. ITC-Messungen ließen wie in **Kapitel 3** beschrieben nur Rückschlüsse auf die thermodynamischen Profile der Liganden zu.

Die Inhibitionskonstanten der drei Verbindungen gegenüber der *Z. mobilis* TGT liegen im dreistellig nanomolaren Bereich (**Tabelle 7.1**). Vergleichbare Affinitäten wurden schon für die in **Kapitel 2** beschriebenen Monosaccharid-basierten Liganden, die die Ribose-34-Tasche adressieren, festgestellt. Die leicht verbesserte Affinität von **7.1** ($K_i = 243 \pm 14$ nM) im Vergleich zu der an 2'OH der Furanose unmethylierten Verbindung **2.6c** (**Kapitel 2** bzw. **3.3** in **Kapitel 3**; $K_i = 353 \pm 106$ nM) zeigt exemplarisch, dass die Verdrängung von Wassermolekülen die Bindungsaffinität leicht steigern kann, auch wenn der Unterschied (Faktor 1.5) nur sehr gering ausgeprägt ist (**Abbildung 7.1a**).

Da sich die Affinitäten von **7.2** und **7.3**, die mit dem Enzym sowohl in der konventionellen wie auch in der *verdrehten* dimeren Form kristallisieren, nicht wesentlich unterscheiden im Vergleich zu **7.1**, das offensichtlich nur als konventionelles Dimer kristallisiert, legt nahe, dass die Transformation vom konventionellen zum *verdrehten* Dimer keinen massiven Einfluss auf die Bindungsaffinität der Liganden nach sich zieht.

Die Werte der nativen nanoESI-MS Messungen zeigen (**Tabelle 7.1**), dass **7.1** – **7.3** vergleichbare Auswirkungen, wie die Verbindungen aus **Kapitel 3**, auf die Erhöhung des Monomeranteils und somit auf die Dimerstabilität haben. Die genannte Technik diskriminiert jedoch nicht zwischen dem *verdrehten* Dimer (aufgefunden in Kokristallen der Raumgruppe $P2_1$) und dem konventionellen Dimer (aufgefunden in Kokristallen der Raumgruppe $C2$). Die gemessenen Monomeranteile sind für **7.2** und **7.3** in gleichem Maße erhöht wie für **7.1**, welches mit der TGT ausschließlich in der konventionellen Dimerpackung kokristallisiert. Möglicherweise lässt sich dies als ein Hinweis werten, dass sowohl das konventionelle wie auch das *verdrehte* Dimer in der Gasphase vorliegen und beide von ähnlicher Stabilität im Komplex mit diesen Liganden (**7.2** und **7.3**) sind. **Abbildung 3.14a** zeigt, dass das *verdrehte* Dimer unfähig sein sollte, das tRNA Substrat in dieser dimeren Form zu binden und daher als katalytisch inaktiv angesehen werden kann.

ITC-Titrations zeigen für alle drei neu vorgestellten Liganden (**7.1** – **7.3**) gleiches Verhalten wie schon für **2.6c** aus **Kapitel 2** (bzw. in **Kapitel 3** ist dieser Ligand als **3.3** aufgeführt). Bei direkter Titration der Liganden in die TGT-Lösung wurden keine ausreichenden enthalpischen Signale detektiert (**Tabelle 12.1**). Nur durch Verdrängung einer zu 90% gesättigten Lösung von **7.1** – **7.3** mit dem unsubstituierten stark enthalpisch bindenden *lin*-Benzoguanin konnten Wärmesignale detektiert werden.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Da durch den Radioaktivassay bei allen drei Verbindungen Affinitäten im dreistellig nanomolaren Bereich ermittelt wurden, kann aufgrund fehlender enthalpischer Signale in den ITC Experimenten von einem überwiegend entropisch-getriebenen Bindungsverhalten der Liganden ausgegangen werden. Die Liganden **7.2** und **7.3** zeigen in den Kokristallstrukturen der Raumgruppe C2 (TGT·**7.2**_{co}^{C2} und TGT·**7.3**_{co}^{C2}) erstmals, dass ihre Bindung von entropischer Natur sein muss, da ihre Bindung mit starken konformativen Adaptionen und Umlagerungen einhergeht.

7.4 Zusammenfassung

Die vorliegende Arbeit basiert auf den Erkenntnissen die in **Kapitel 3** vorgestellt wurden. Mit **7.1 - 7.3** wurden drei neue Liganden untersucht, die die TGT vergleichbar in ihrer katalytischen Funktion blockieren. Durch die zusätzliche Methylierung der 2'-OH Gruppe von **7.1**, konnte im Vergleich zu der an dieser Stelle nicht methylierten Verbindung (**2.6c** bzw. **3.3**) die Affinität leicht gesteigert werden, bei sonst unverändertem Bindungsmodus und Einfluss auf die Dimerstabilität.

Liganden **7.2** und **7.3** zeigen beide in ähnlichem Ausmaß, dass ihre Bindung an die TGT mit einer erhöhten Unordnung einhergeht, die nicht nur auf die Ribose-34-Tasche und das angrenzende *Loop-Helix Motiv* beschränkt bleibt. In den erhaltenen Strukturen der Raumgruppe C2 (TGT·**7.2**_{co}^{C2} und TGT·**7.3**_{co}^{C2}) zeigte sich zum ersten Mal, dass die Zink-Subdomäne durch Ligandbindung beeinträchtigt werden kann. Gleichzeitig konnte in den genannten Kristallstrukturen eine um 180° gedrehte Orientierung des Indolrings von Trp326 festgestellt werden, wodurch eine H-Brücke zu Met93 ausbleibt, die als essentiell für die Dimerstabilität angenommen wird. Die Drehung dieses Indolrings war bisher nur in Kristallstrukturen von zwei mutierten Varianten der TGT festgestellt worden. In diesen TGT Varianten, ist das Umklappen von Trp326, das Teil des aromatischen *Hotspots* des Homodimer *Interfaces* ist, mit der Destabilisierung des konventionellen TGT Dimers verbunden. Beide Liganden (**7.2** und **7.3**) konnten ebenfalls in Kokristallstrukturen der Raumgruppe P2₁ und somit in dem *verdrehten* Dimer nachgewiesen werden. In diesen Strukturen zeigen sich jedoch die Liganden in dem eingenommenen Bindungsmodus und die Zink-Subdomäne geordnet und voll populiert. Eine Überlagerung der Kristallstrukturen der Raumgruppen C2 und P2₁ zeigt, dass das Umklappen des Indolrings von Trp326 in allen P2₁-Kristallstrukturen der TGT vorliegt.

7. Störung der Dimerisierung der TGT durch Monosaccharid-basierte Liganden

Dies und die erhöhte Restflexibilität in der Ribose-34-Tasche lässt die Vermutung aufkommen, dass TGT·**7.2**_{co}^{C2} und TGT·**7.3**_{co}^{C2} eine Art erster Schritt hin zur Ausbildung des *verdrehten* Packungsdimers darstellen, wie es in TGT·**7.2**_{co}^{P21} und TGT·**7.3**_{co}^{P21} zu finden ist. Da sowohl das konventionelle Dimer, als auch das *verdrehte* Dimer, in den Kristallstrukturen vorgefunden wurde, lässt die Spekulation zu, dass beide dimeren Formen in Lösung energetisch nahe beieinander vorliegen, wenn das TGT-Enzym mit den jeweiligen Liganden in hoher Konzentration versetzt wird.

Eine Überlagerung der Strukturen des *verdrehten* Dimers mit Strukturen der TGT mit dem gebundenen tRNA-Substrat zeigt, dass das *verdrehte* Dimer inkompatibel mit der katalytischen Funktion der TGT ist (**Kapitel 3**). Im Radioaktivassay wurden jedoch sowohl für **7.2** und **7.3** sowie für **3.9** (**Kapitel 3**) Affinitäten im dreistellig nanomolaren bis einstellig mikromolaren Bereich^[137] ermittelt, wobei letztere Verbindung ausschließlich in dem *verdrehten* Dimer kokristallisiert.

Daraus kann man schließen, dass die drei genannten Liganden das katalytisch inaktive *verdrehte* Dimer induzieren, die Transformation zu dieser Form allerdings mit einer niedrigen, die Affinität nur wenig beeinflussenden Barriere verknüpft sein muss.

Native nanoESI-MS Messungen zeigen, dass **7.1 – 7.3** im vergleichbarem Ausmaß die Monomerkonzentration der TGT erhöhen (bis zu einem Faktor von 3.6 erhöhter Monomeranteil; **Tabelle 7.1**) und somit ähnliche Einflüsse auf die Dimerstabilität nehmen. Diese Technik kann allerdings nur zwischen monomerer und dimerer Form diskriminieren. Einblicke, wie die TGT-Monomere tatsächlich in Lösung zueinander ausgerichtet sind, gibt diese Technik nicht. Das Einbringen einer ¹⁹F-NMR sensitiven Sonde in das TGT System könnte jedoch Einblicke erlauben, in welcher dimeren Form die TGT in Lösung tatsächlich vorliegt^[184]. Ein nächster Design-Zyklus von Inhibitoren der TGT könnte den Ansatz verfolgen, die *verdrehte* dimere Form weiter zu stabilisieren, so dass nicht die Störung des konventionellen Dimers, sondern die Stabilisierung des katalytisch inaktiven, *verdrehten* Dimers im Vordergrund steht.

8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

8.1 Vorwort

Dieses Kapitel basiert auf dem Artikel und der zugehörigen Supporting Information „An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)“ von Christoph Hohn, Adrian Härtsch, Frederik R. Ehrmann, Toni Pfaffender, Nils Trapp, Oliver Dumele, Gerhard Klebe, und François Diederich^[2], publiziert in *Chem. Eur. J.* 2016⁽¹⁾. Der Beitrag des Autors der vorliegenden Arbeit lag bei der Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT, der Bestimmung der kinetischen Inhibitionskonstante durch den Radioaktivassay, röntgenkristallographische Untersuchungen und wesentliche Beiträge zur Erstellung des Manuskripts.

⁽¹⁾ Reprinted and adapted with permission from *Chem. Eur. J.* **2016**, **20**, 6750-6754.
Copyright 2016 John Wiley & Sons, Inc.

8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

8.2 Abstract

Shigellosis is one of the most severe diarrheal diseases worldwide without any efficient treatment so far. The enzyme tRNA-guanine transglycosylase (TGT) has been identified as a promising target for small-molecule drug design. Herein, we report a transition-state analogue, a small, immucillin-derived inhibitor, as a new lead structure with a novel mode of action. The complex inhibitor synthesis was accomplished in 18 steps with an overall yield of 3%. A co-crystal structure of the inhibitor bound to *Z. mobilis* TGT confirmed the predicted conformation of the immucillin derivative in the enzyme active site.

8.3 Introduction

The diarrheal disease shigellosis caused by *Shigella* bacteria is a severe, life-threatening burden worldwide^[37]. In 2013, the annual mortality caused by shigellosis was estimated to be 73,900 deaths, whereas 45% of all *Shigella*-related deaths are observed for children younger than five years old^[37]. Emerging antimicrobial resistance against common therapies indicates the urgent need for different treatments with new modes of action against shigellosis^[185, 186]. The enzyme tRNA-guanine transglycosylase (TGT, EC 2.4.2.29) was identified in mutational studies as a possible target for small-molecule drug design^[66]. In prokaryotes and eukaryotes, the enzyme post-transcriptionally modifies tRNA by exchanging guanine with a hypermodified nucleobase at position 34 (wobble position) in the anticodon of certain tRNAs. Bacteria use TGT to insert preQ₁ into tRNA, which is further transformed to queuine in a downstream process^[135, 187]. In contrast, eukaryotes lack the ability to synthesize queuine de novo, but rely on the uptake from nutrition and direct incorporation into tRNA catalyzed by TGT^[178]. This difference provides a basis of selectivity for the planned bacterial inhibitors.

The catalyzed reaction of bacterial TGT proceeds through a ping-pong mechanism^[83, 131, 188] beginning with the excision of the nucleobase in a substitution reaction with Asp280 *via* transition-state TS1 (**Figure 8.1a**), which is similar to the transition state of the depurination reaction (**Figure 8.1b** and Figure S1 in the Supporting Information^[2]) catalyzed by human purine nucleoside phosphorylase (PNP, EC 2.4.2.1). The enzyme catalyzes the phosphorylation of purine nucleosides and follows a S_N1-type mechanism. Immucillins are known as potent transition-state analogues (TSA) against human PNP and derivatives are currently in clinical trials for the treatment against B-cell acute lymphoblastic leukemia and autoimmune disorders^[189-192].

8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

The designed immucillin inhibitors mimic the ribooxacarbenium ion-like cationic transition state, while the modified nucleobase cannot be cleaved due to the unnatural, noncleavable glycosidic C-C bond^[193]. Both PNP and TGT belong to the same enzyme class (transferase) with related reaction mechanisms but very different natural substrates. This fact encouraged us to synthesize the immucillin derivative **8.1** (**Figure 8.1c**) to inhibit TGT in a transition-state-analogous way and to introduce this class of inhibitors as leads towards a potential treatment of shigellosis. The designed and ultimately prepared transition-state-analogous inhibitor features a protonated azasugar moiety (Section S4, Supporting Information^[2]), mimicking the ribooxacarbenium ionlike cationic character of TS1^[194, 195]. The second protonation of **8.1** occurs on the 2-aminopyrimidinone ring at N(1), similar to what was observed for *lin*-benzoguanines in complex with TGT^[114, 118].

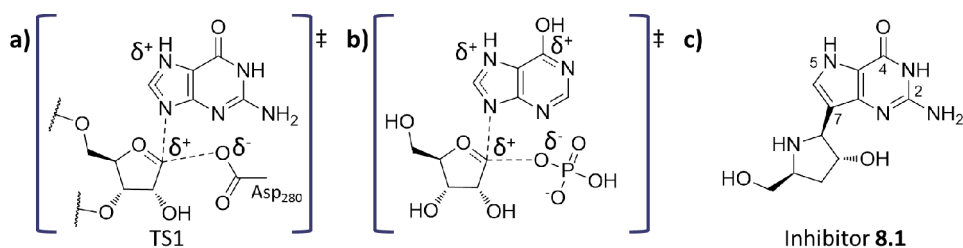


Figure 8.1. Representation of the transition states of nucleobase cleavage catalyzed by **a)** TGT (TS1; Figure S1 in the Supporting Information) and **b)** PNP. **c)** The designed inhibitor **8.1** with atom numbering.

An overlay of the available crystal structure of a preQ₁-modified tRNA·TGT complex (*Zymomonas (Z.) mobilis*, PDB ID 1Q2S; 3.2 Å^[16]) and the immucillin derivative **8.1**, which was energy-minimized within the active site using the program MOLOC^[181], clearly indicates the desired binding mode (**Figure 8.2**). We assume that the void between N(5) of the pyrrole moiety and the backbone Leu231-Ala232 region of the enzyme is filled by water molecules.

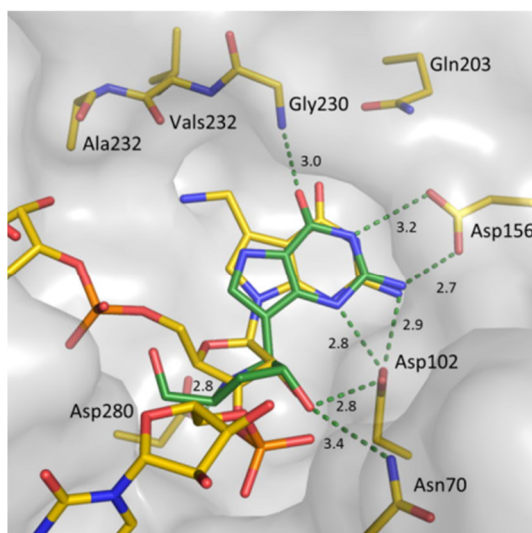


Figure 8.2. Overlay of modeled inhibitor **8.1** (green) with preQ₁³⁴-tRNA (yellow), both in complex with *Z. mobilis* TGT (PDB code 1Q2S; 3.2 Å^[16]) showing the assumed protein–ligand interactions. Both pyrrolidine and N(1) in the deazaguanine ring are protonated in the modeling. Distances are given in Å. Atom coloring: N: blue, O: red, P: orange.

8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

Previous inhibitors based on 2-amino-*lin*-benzoguanine (6-amino-2-(methylamino)imidazo[4,5*g*]quinazolin-8(7*H*)-one) as a central ligand scaffold bind with inhibition constants in the low nanomolar range to TGT ($K_i = 2 - 58$ nM)^[12, 14], but show insufficient physicochemical properties^[114]. This drawback of the *lin*-benzoguanine-based inhibitors could possibly be avoided by using immucillins as novel lead structures^[189-192, 196]. Herein, we report the efficient and high-yielding synthesis of the immucillin derivative **8.1**, its biological affinity, and the co-crystal structure of *Z. mobilis* TGT in a complex with **8.1** (TGT·**8.1**_{CO}^{C2}; PDB ID: 5EGR), which confirms the predicted binding mode.

8.4 Results and Discussion

8.4.1 Synthesis

The synthesis of pure **8.1** is described in the publication and Supporting Information corresponding to **Chapter 8** (Hohn *et al.* (2016)^[2]).

8.4.2 Single-molecule crystal structure and modelled TGT complex with inhibitor **8.1**

We compared the conformation of **8.1** energy-minimized at the active site of TGT (**Figure 8.3a**) using the program MOLOC^[181] with free **8.1** minimized with explicit water solvent by using Hybrid Monte Carlo (HMC) force field simulations (**Figure 8.3b** and Section S3 in the Supporting Information)^[197, 198] and the conformation of **8.1** seen in the single-molecule crystal structure (**Figure 8.3c**). In the crystal, the inhibitor adopts two conformations. The crystal lattice encapsulates one molecule of 1,4-dioxane (Section S6.3 in the Supporting Information). Conformer I (**Figure 8.3c**) features a similar conformation to the geometry of **8.1** when modeled into the active site of TGT or simulated with explicit water by HMC calculations. A small difference in the torsion of the charged pyrrolidinium ring (X-ray: 41°, modeled TGT-bound **8.1**: 27°, HMC: 28°) is observed. The different orientation of the primary OH group of **8.1** in the crystal is probably caused by ionic H-bonding ($d(\text{Cl}^- \cdots \text{O}) = 3.1$ Å) to a chloride ion in the lattice. The comparison between the “unbound” ligand in the crystal, in the modeled TGT complex, and in the water box suggests a high degree of ligand preorganization, and the conformational Gibbs energy penalty for complex formation with the enzyme should correspondingly be low.

8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

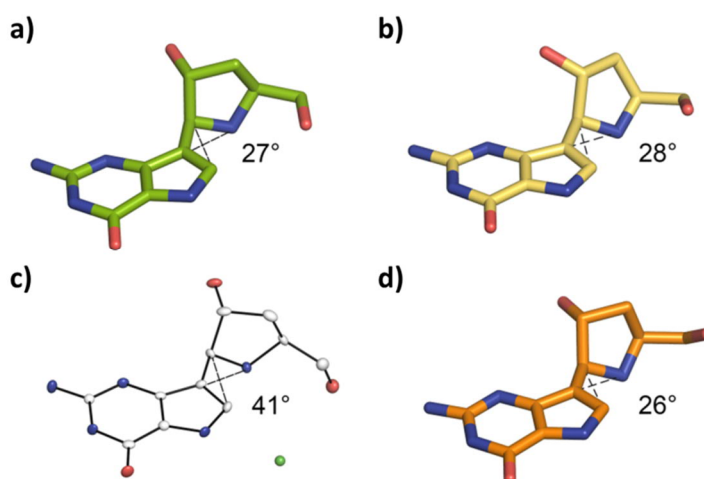


Figure 8.3. Comparison of free and bound conformations of **8.1** confirming a high degree of preorganization prior to binding. **a)** Inhibitor **8.1** energy-minimized by MOLOC^[181] at the active site of TGT (green). **b)** Optimized conformation of **8.1** by Hybrid Monte Carlo MD simulations with explicit solvent. **c)** ORTEP plot showing conformer I seen in the single-molecule crystal structure of **8.1**. **d)** Torsion angle of ligand **8.1** from the co-crystal structure with TGT (TGT·**8.1**_{CO}^{C2}; orange). Atom coloring: N: blue, O: red.

8.4.3 Co-crystal structure of *Z. mobilis* TGT with inhibitor **8.1** and inhibition constant determination

The co-crystal structure of *Z. mobilis* TGT in complex with **8.1** was obtained with a resolution of 1.55 Å (**Figure 8.4**; TGT·**8.1**_{CO}^{C2}; PDB ID 5EGR). Details of the data collection, processing, and refinement statistics are given in **Table 12.2**. The ligand is bound in the predicted mode and engages in an extended hydrogen-bond network. The 26° torsion angle between the azasugar moiety and the plane of the deazaguanine (**Figure 8.3d**) core closely matches the predicted 27° and 28° torsions (**Figures 8.3a,b**). The pyrrolidinium NH₂⁺ undergoes H-bond-assisted ion pairing with the side chain of Asp280 ($d(\text{N}^+ \cdots \text{O}_{\text{Asp280}}) = 3.2 \text{ \AA}$). The secondary alcohol accepts an H-bond from Asn70 ($d(\text{O} \cdots \text{N}_{\text{Asn70}}) = 3.3 \text{ \AA}$) and donates a strong one to Asp102 ($d(\text{O} \cdots \text{O}_{\text{Asp102}}) = 2.7 \text{ \AA}$). Furthermore, a 45° rotation of Asp102 compared to the preQ₁·TGT complex allows a planar salt bridge contact to the inhibitor ($d(\text{N} \cdots \text{O}_{\text{Asp102}}) = 2.8$ and $d(\text{N}^+ \cdots \text{O}_{\text{Asp102}}) = 2.7 \text{ \AA}$). The close proximity of N(1) to the side chain of Asp102 suggests that the ligand binds in a dicationic form, with protonation occurring not only on by far the most basic pyrrolidine nitrogen atom^[199] but also on N(1). Protonation of the aminopyrimidinone ring had also been observed in the co-crystal structure of *lin*-benzoguanines^[114, 118]. The recognition of the deazaguanine bicycle is further mediated by ionic hydrogen bonds to the side chain of Asp156 ($d(\text{N} \cdots \text{O}_{\text{Asp156}}) = 2.8$ and $d(\text{N}^+ \cdots \text{O}_{\text{Asp156}}) = 2.9 \text{ \AA}$), and two neutral H-bonds with the side chain of Gln203 ($d(\text{O} \cdots \text{N}_{\text{Gln203}}) = 3.1 \text{ \AA}$) and the backbone NH of Gly230 ($d(\text{O} \cdots \text{N}_{\text{Gly230}}) = 2.9 \text{ \AA}$).

8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

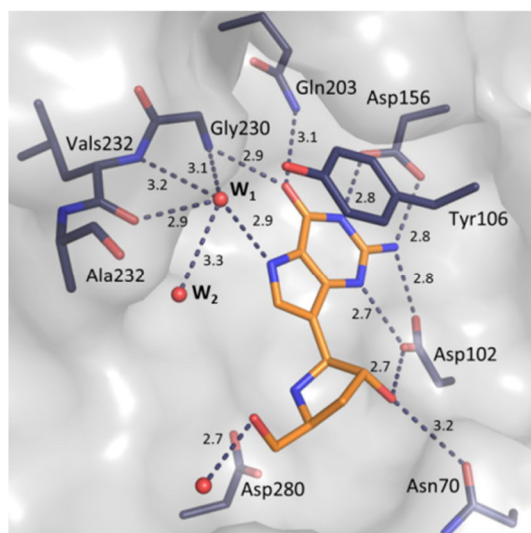


Figure 8.4. Co-crystal structure (TGT-**8.1**_{CO}^{C2}; PDB ID: 5EGR; 1.55 Å) of immucillin derivative **8.1** (orange) with *Z. mobilis* TGT (blue). Hydrogen-bonding interactions between ligand and protein and to the encapsulated water molecules **W**₁ and **W**₂ depicted as red spheres are shown. The gray solvent accessible surface defines the size of the binding pocket. Distances are given in Å; atom coloring: N: blue, O: red.

The space between the pyrrole N(5)H and the backbone Leu231-Ala232 is filled with two water molecules **W**₁ and **W**₂ as we had presumed in the modeling^[200]. Water **W**₁ solvates the backbone of Leu231 ($d(\mathbf{W}_1 \cdots \text{N}_{\text{Leu231}}) = 3.2 \text{ Å}$ and $d(\mathbf{W}_1 \cdots \text{O}_{\text{Leu231}}) = 2.9 \text{ Å}$) and forms a hydrogen bond to the pyrrole N(5)H ($d(\mathbf{W}_1 \cdots \text{N}) = 2.9 \text{ Å}$). The deazaguanine moiety of **8.1** is intercalated between the side chains of Tyr106 and Met260, similar to the binding geometry of *lin*-benzoguanine-based inhibitors (Figure S15 in the Supporting Information^[2)]^[118]. π - π -Stacking with the phenolic side chain of Tyr106 occurs at 3.7 Å ^[201]. On the other hand, this side chain undergoes a pronounced movement to participate with its O-atom in the tetrahedral coordination of **W**₁ ($d(\mathbf{W}_1 \cdots \text{O}_{\text{Tyr106}}) = 2.7 \text{ Å}$) (Figure S15 in the Supporting Information). The second water molecule **W**₂ further solvates the backbone C=O of Leu231 ($d(\mathbf{W}_2 \cdots \text{O}_{\text{Leu231}}) = 2.7 \text{ Å}$) and is in short distance to **W**₁ ($d(\mathbf{W}_1 \cdots \mathbf{W}_2) = 3.3 \text{ Å}$).

Most noteworthy is the observed orientation of the peptide bond between Leu231 and Ala232, which plays a crucial role within the catalytic cycle^[202]. In the complex of **8.1**, the backbone C=O of Leu231 points towards the active site. Such a conformation is found in the product (preQ₁³⁴-tRNA) bound state. In contrast, in the substrate (G³⁴-tRNA) bound state, the peptide bond is flipped and the backbone NH of Ala232 faces towards the active site^[202]. Side-chain-protonated Glu235 forms an H-bond with the C=O group of Leu231, while upon deprotonation a peptide flip is observed and Glu235 accepts the hydrogen bond of NH_{Ala232}^[16] as is now also observed in the co-crystal structure with the inhibitor **8.1** resembling the transition state.

8. An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT)

An inhibition constant (K_i) of $2.7 \pm 1.6 \mu\text{M}$ was determined for **8.1** by a published *E. coli* tRNA^{Tyr} assay monitoring the incorporation of 8-^[3H]-guanine (**Chapter 11.6.1**)^[89, 113, 137]. This K_i value is much higher compared to those reported for common TS analogues, which often reach into the picomolar affinity range^[203]. To rationalize the measured value, the large size of the natural tRNA substrate and the corresponding large size of the TGT active site need to be compared to the small size of our immucillin-based inhibitor **8.1**. Nonetheless, one example has been reported, in which an immucillin derivative with a binding affinity in the high μM range ($>500 \mu\text{M}$) could be strongly improved by incorporating the inhibitor into larger RNA oligonucleotides ($2 - 9 \text{ nM}$)^[203-206]. Presumably, similar conditions are given in our case.

8.5 Conclusion

In conclusion, we reported the high-yielding synthesis of an immucillin derivative **8.1** and its establishment as a new lead structure for drug design against shigellosis, targeting the enzyme TGT. The ability of immucillin-based inhibitors to penetrate membranes^[207] and their higher solubility in contrast to the extended *lin*-benzoguanines of previous studies renders the novel lead structure very attractive for further optimization. The co-crystal structure of **8.1** bound to *Z. mobilis* TGT was solved, and ligand **8.1** adopts a similar conformation at the enzyme active site to the one seen in a single molecule crystal structure and in energy minimizations in explicit water, which clearly shows its high degree of preorganization for binding. Further developments of the new lead **8.1**, targeting a larger area of the spacious tRNA binding site, are now under way.

8.6 Experimental Section

Detailed information about experimental details for the synthesis of **8.1** can be found in the publication and Supporting Information corresponding to **Chapter 8** (Hohn *et al.* (2016)^[2]). Details about TGT expression, purification, inhibition constant determination and crystallization procedure can be found in **Chapter 11**.

9. Fragment-basierte Leitstruktursuche anhand der Aspartylprotease Endothiapepsin

9.1 Vorwort

In diesem Kapitel wird eine ausführliche und extensive kristallographische Analyse zusammengefasst, die in einem Team von neun Kristallographen der Arbeitsgruppe Klebe durchgeführt wurde und die bislang in fünf Publikationen mündete (**Tabelle 9.1**). Eine aus 361 Fragmenten bestehende *in-house*-Fragmentbibliothek wurde durch *Soaking* röntgenkristallographisch auf das Zielenzym Endothiapepsin durchgemustert. Insgesamt konnte eine Trefferausbeute von 20% (71 *Soaking*-Strukturen) gebundener Fragmente in den Kristallstrukturen erhalten werden. Der Beitrag des Autors der vorliegenden Dissertation bestand zum einen in der Durchsicht und anfänglichen Verfeinerung von 35 *Soaking*-Kristallstrukturen (Fragment 176 bis einschließlich Fragment 210), aus denen sechs Kristallstrukturen mit gebundenem Fragment hervorgingen und die verfeinert in der PDB hinterlegt wurden (**Tabelle 12.2**). Zum anderen wurde neben der Verfeinerung der sechs *Soaking*-Komplexstrukturen auch an der Etablierung eines standardisierten Verfeinerungsprotokolls für die 361 Datensätze mitgearbeitet und der Grundstein für eine Publikation über falsch-positive Treffer in biophysikalischen *Screening*-Verfahren geliefert. In den resultierenden Publikationen hat der Autor der vorliegenden Arbeit unterschiedlich große Beiträge geleistet^[4-7].

9.2 Resultierende Publikationen

Tabelle 9.1. Resultierende Publikationen des Fragment-basierten Projekts der Aspartylprotease Endothiapepsin.

Titel, Autorenschaft und Journal

Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study, Schiebel, J., Radeva, N., Krimmer, S.G., Wang, X., Stieler, M., Ehrmann, F.R., Fu, K., Metz, A., Huschmann, F.U., Weiss, M., Mueller, U., Heine, A., Klebe, G. (2016) *ACS Chem. Biol.* 11, 1693-1701

Active Site Mapping of an Aspartic Protease by Multiple Fragment Crystal Structures: Versatile Warheads to Address a Catalytic Dyad, Radeva, N., Schiebel, J., Wang, X., Krimmer, S.G., Fu, K., Stieler, M., Ehrmann, F.R., Metz, A., Rickmeyer, T., Betz, M., Winquist, J., Park, A.Y., Huschmann, F.U., Weiss, M., Mueller, U., Heine, A., Klebe, G. (2016) *J. Med. Chem.* 59, 9743-9759

Experimental Active-Site Mapping by Fragments: Hot Spots Remote from the Catalytic Center of Endothiapepsin, Radeva, N., Krimmer, S.G., Stieler, M., Fu, K., Wang, X., Ehrmann, F.R., Metz, A., Huschmann, F.U., Weiss, M., Mueller, U., Schiebel, J., Heine, A., Klebe, G. (2016) *J. Med. Chem.* 59, 7561-7575.

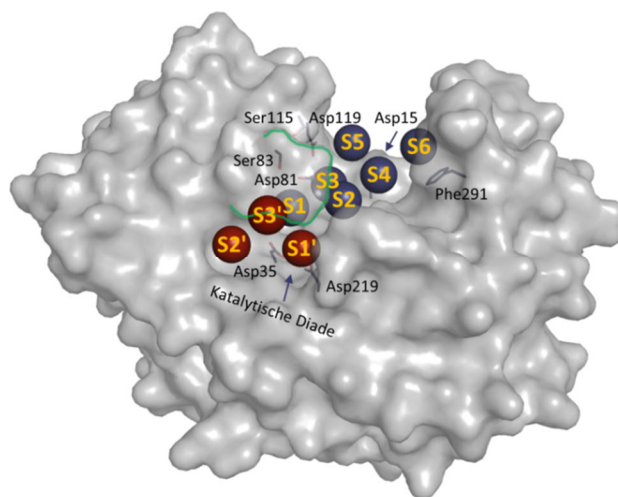
High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits, Schiebel, J., Krimmer, S.G., Röwer, K., Knörlein, A., Wang, X., Park, A.Y., Stieler, M., Ehrmann, F.R., Fu, K., Radeva, N., Krug, M., Huschmann, F.U., Glöckner, S., Weiss, M., Mueller, U., Klebe, G., Heine, A. (2016) *A. Structure* 24, 1398-1409

Watch out for the Red Herring: Surprising Reactivity of a Fragment Results in Biological Activity, Cramer, J., Schiebel, J., Wulsdorf, T., Grohe, K., Najbauer, E.E., Ehrmann, F.R., Radeva, N., Zitzer, N., Linne, U., Linser, R., Heine, A., Klebe, G. (2016) *Angew. Chem.*

9.3 Zusammenfassung der Ergebnisse

Seit der erstmaligen Erwähnung von Fragment-basiertem Wirkstoffdesign im Jahr 1996^[208] ist in der letzten Zeit die Leitstruktursuche auf Fragment-Basis (*Fragment-based lead discovery*, FBLD) immer mehr in der präklinischen Arzneistoffentwicklung aufgegriffen worden^[209-211]. Die Wirkstoffsuche beginnt mit Fragment-ähnlichen Verbindungen (MW < 250 Da), die später zu potenten Liganden entwickelt werden, die als Kandidaten für die klinischen Studien infrage kommen. Typischerweise werden bei der FBLD zwei oder mehrere biophysikalische Methoden zum *Screening* einer Fragmentbibliothek als Filter benutzt und infolge werden entdeckte Treffer röntgenkristallographisch als *follow-up* Validierung untersucht. Als Filter werden unter anderem *native* MS (native Massenspektroskopie), TSA (*Thermal shift assay*), STD-NMR (*Saturation-transfer difference*), SPR (*Surface plasmon resonance*), MST (*Microscale thermophoresis*) oder ITC (Isothermale Titrationskalorimetrie) in Betracht gezogen^[209, 212-215]. Grundvoraussetzung für eine erfolgreiche FBLD ist allerdings die strukturelle Information aus der Röntgenkristallographie. Dabei stellt sich die entscheidende Frage, ob die üblicherweise angewendete *Screening*-Kaskade vor der röntgenkristallographischen Analyse sinnvoll und effizienzsteigernd ist. Die Treffer aus den 361 untersuchten Fragment-Kristallstrukturen der Aspartylprotease Endothiapepsin (**Abbildung 9.1**) wurden mit den Treffern aus den sechs eingangs erwähnten biophysikalischen *Screening*-Methoden verglichen^[4].

Die resultierenden 71 Komplexstrukturen bei diesem Projekt sprechen allerdings für sich. Von diesen Fragmenten binden insgesamt 41 Fragmente an die katalytische Diade und besetzen vorwiegend die benachbarten Spezifizitätstaschen S1 und S1' (**Abbildung 9.1**) (detaillierte Informationen sind in dem Artikel und der zugehörigen Supporting Information Radeva *et al.* (2016)^[5] zu finden).



155

9. Fragment-basierte Leitstruktursuche anhand der Aspartylprotease Endothiapepsin

Die genannten 41 gebundenen Fragmente in den *Soaking*-Strukturen bestätigen zum einen bekannte funktionelle Gruppen zur Adressierung der katalytischen Diade des Endothiapepsin-Enzyms. Zum anderen wurden aber auch neuartige funktionelle Kopfgruppen wie z.B. Hydrazide, Pyrazole oder Carbonsäure-Funktionen entdeckt.

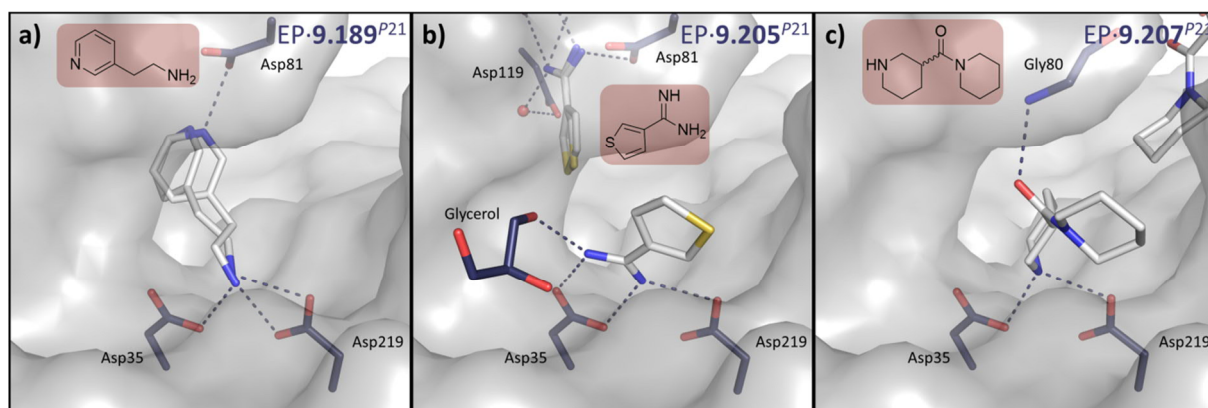


Abbildung 9.2. Bindungsmodus der Fragmente an der katalytischen Diade. **a)** Fragment **189** (EP-9.189^{P21}, PDB ID: 4Y3H), **b)** Fragment **205** (EP-9.205^{P21}, PDB ID: 4Y3L) und **c)** Fragment **207** (EP-9.207^{P21}, PDB ID: 4Y3T). Die Strukturformel des jeweiligen Fragments ist in den Abbildungen rot hinterlegt. Farbcode: Kohlenstoff_{Protein} dunkelblau, Kohlenstoff_{Fragment} weiß, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken sind als dunkelblaue gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.7 und 3.0 Å).

Von den identifizierten Fragmenten, die die katalytische Diade adressieren, wurden drei *Soaking*-Fragmentstrukturen durch den Autor der vorliegenden Arbeit beigetragen. Dabei handelt es sich um das Fragment **189** (primäres Amin; **Abbildung 9.2a**), Fragment **205** (Thiophenamidin; **Abbildung 9.2b**) und Fragment **207** (Piperidin/ Sekundäres Amin; **Abbildung 9.2c**).

Die erfolgreiche Optimierung von Leitstrukturen erfordert eine gründliche Kartographie der Bindetaschen des Zielenzyms, vor allem in Regionen außerhalb des aktiven Zentrums, wo dennoch hochkonservierte Regionen einer Proteinfamilie liegen können. Von den 71 kristallographischen Treffern wurden 45 Fragmente außerhalb der katalytischen Diade identifiziert^[6]. Dabei konnten abseits des aktiven Zentrums von Endothiapepsin drei *Hotspots* identifiziert werden: Asp81, Asp119 und Phe291. Verglichen mit den Fragmenten, die an die katalytische Diade binden, sind die *remote*-bindenden Fragmente etwas voluminöser. Viele der 45 Fragmente bieten Optimierungskonzepte an, aus denen größere Liganden mit höherer Aktivität und Selektivität entstehen könnten (detaillierte Informationen sind in dem Artikel und der zugehörigen Supporting Information Radeva *et al.* (2016)^[6] zu finden).

Von den 45 *remote*-bindenden Fragmenten wurden vier *Soaking*-Strukturen vom Autor der vorliegenden Dissertation beigetragen. Die Fragmente **181** (**Abbildung 9.3a**), **205** (**Abbildung 9.3b**), **206** (**Abbildung 9.3c**) und **207** (**Abbildung 9.3d,e**) binden außerhalb des aktiven Zentrums. Anzumerken ist, dass die Fragmente **205** und **207** sowohl an die katalytische Diade, als auch *remote*, binden. Von beiden Fragmenten waren insgesamt drei unterschiedliche Bindungsmodi in den Kristallstrukturen festzustellen. Bei Fragment **207** ist ein Bindungsmodus nur teilweise durch die Elektronendichte definiert (**Abbildung 9.3e**). Diese, nicht vollständig modellierte Kopie des Fragments **207**, bindet nahe der aromatischen Aminosäure Phe291. Während die Fragmente **205** und **206** Asp81 adressieren, interagiert das Fragment **181** durch π - π -Wechselwirkungen mit Phe291. Einer der drei Bindungsmodi von Fragment **207** bindet in der Nähe von Asp81 und besetzt dort die S2-Tasche. Es sind dort allerdings keine sichtbaren Wechselwirkungen zu dem Protein erkennbar. Interessanterweise, wurden für dieses Fragment beide Enantiomere in der *Soaking*-Kristallstruktur identifiziert. Während das *R*-Enantiomer die katalytische Diade adressiert, kann das *S*-Enantiomer in der S2-Tasche vorgefunden werden. Für das dritte, nur partiell modellierte, Fragment **207** kann die vorliegende Stereochemie nicht festgestellt werden, da das chirale Zentrum in dem Teil des Fragments auftritt, der in der *Soaking*-Kristallstruktur in der Elektronendichte als nicht definiert verbleibt (**Abbildung 9.3e**).

9. Fragment-basierte Leitstruktursuche anhand der Aspartylprotease Endothiapepsin

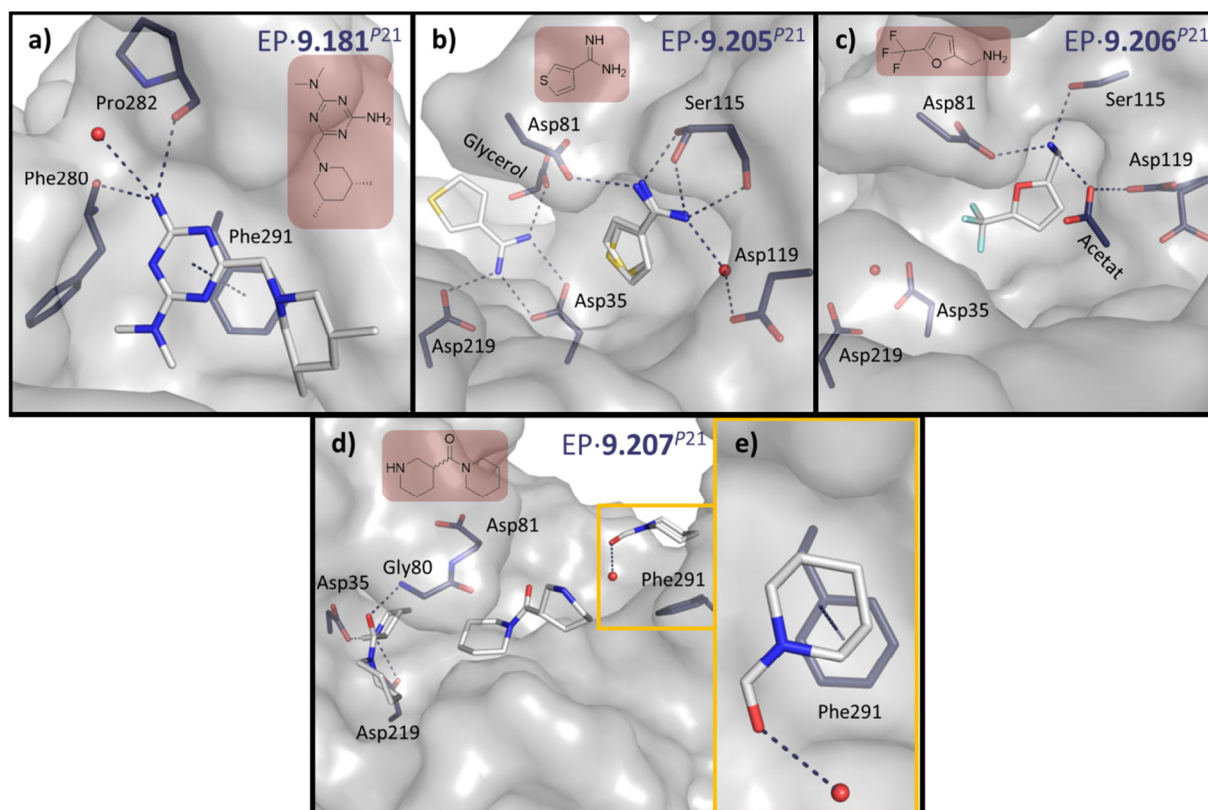


Abbildung 9.3. Bindungsmodus der Fragmente, die *remote* an Endothiapepsin binden. **a)** Fragment **181** (EP-9.181^{P21}, PDB ID: 4Y3A), **b)** Fragment **205** (EP-9.205^{P21}, PDB ID: 4Y3L), **c)** Fragment **206** (EP-9.206^{P21}, PDB ID: 4Y5A) und **d)** Fragment **207** (EP-9.207^{P21}, PDB ID: 4Y4T). Die Strukturformel des jeweiligen Fragments ist in den Abbildungen rot hinterlegt. Farbcode: Kohlenstoff_{Protein} dunkelblau, Kohlenstoff_{Fragment} weiß, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Schwefel gelb, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken sind als dunkelblaue gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen zwischen 2.6 und 3.2 Å).

Für die strukturelle Identifizierung von Zielverbindungen für die spätere Wirkstoffentwicklung ist es in der Röntgenkristallstruktur häufige Praxis die Elektronendichte auf der Basis der Phasen einer anderen gut aufgelösten Struktur auszuwerten. Anhand der 361 Datensätze konnte gezeigt werden, dass ungefähr 25% aller Treffer ohne stufenweise Verfeinerung mit Neuberechnung der Phaseninformation nicht detektiert worden wären^[7]. Exemplarisch kann an der *Soaking*-Kristallstruktur EP-9.181^{P21} (PDB ID: 4Y3A) gezeigt werden, dass die anfänglich berechnete Elektronendichte nicht ausgereicht hätte, um das Fragment **181** zu identifizieren und es als Treffer zu kategorisieren (**Abbildung 9.4**).

Um schnell und zuverlässig auch die fehlenden 25% der Treffer zu identifizieren, wurde ein automatisches Verfeinerungsprotokoll entwickelt, welches die Identifizierung von Fragmenten in Kristallstrukturen optimiert und standardisiert (detaillierte Informationen sind in dem Artikel und der zugehörigen Supporting Information Schiebel *et al.* (2016)^[7] zu finden).

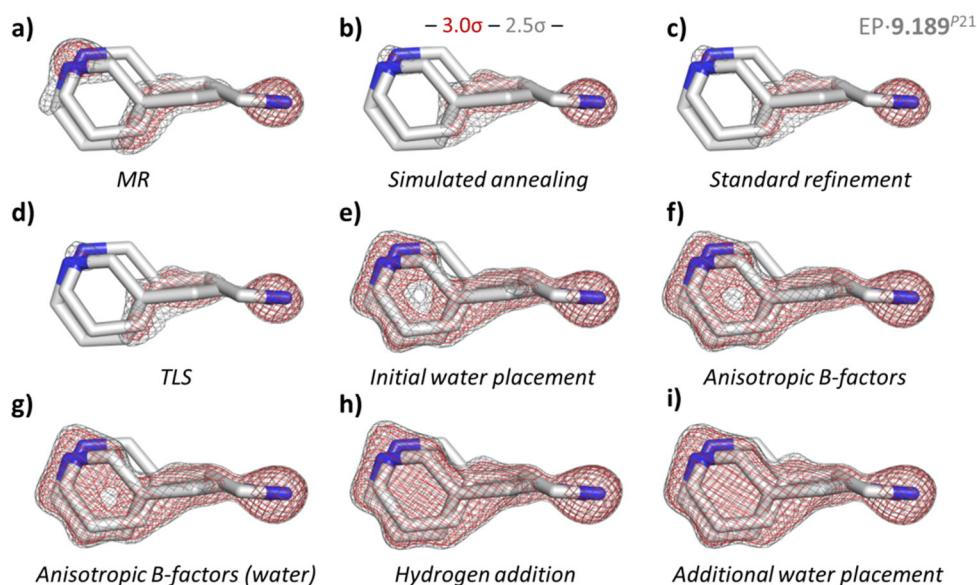


Abbildung 9.4. Schrittweise Verbesserung der Elektronendichte für Fragment **189** (EP·9.189^{P21}, PDB ID: 4Y3H), welches in zwei alternativen Konformationen modelliert wurde. Angepasst nach Schiebel et al. (2016)^[7]. **a) – i)** Darstellung der $mF_o - DF_c$ Differenzelektronendichte für das Fragment **189** nach jedem der einzelnen Verfeinerungsschritte, der in dem Projekt entwickelten Verfeinerungsprozedur, als rote und graue Maschen bei 3.0 bzw. 2.5 σ -Niveau. Die Verfeinerung beinhaltet: **a)** MR (Molecular Replacement), **b)** Simulated annealing, **c)** Standard refinement, **d)** TLS (Translation, Liberation, Screw), **e)** Initial water placement, **f)** Anisotropic B-factors refinement, **g)** Refinement of anisotropic B-factors including water molecules, **h)** Hydrogen addition und **i)** Additional water placement. Farbcode: Kohlenstoff weiß, Stickstoff blau.

Mit der steigenden Zunahme von Fragment-basierten Ansätzen zur Identifizierung von Leitstrukturen darf die Beachtung von falsch-positiven Treffern jedoch nicht außer Acht gelassen werden. Vor allem die geringe Größe und die entsprechend gering erwartete Affinität der Verbindungen führt die genutzten biophysikalischen *Screening*-Verfahren an die Grenze der Bestimmungsgenauigkeit und erhöht so die Fehlerrate. Das Verfolgen von falsch-positiven Treffern in der Arzneimittelentwicklung kann zu erheblicher Verschwendung von Zeit und Ressourcen führen.

In einer Studie, die die Kristallstruktur des vermeintlichen Fragments **177** (EP·9.177^{P21}, PDB ID: 5LWR) als Ausgangspunkt nutzt, konnte gezeigt werden, dass ein Treffer in mehreren biophysikalischen *Screening*-Verfahren fälschlicherweise als das potenteste Fragment gegenüber der Aspartylprotease Endothiapepsin aufgefallen war. Nur durch die *Soaking*-Kristallstruktur wurde das Fragment als falsch-positiver Treffer demaskiert (**Abbildung 9.5**). Das identifizierte Molekül zeigt seine biologische Aktivität vornehmlich durch chemische Umwandlung von Fragment **177** in eine andere Molekülformation durch eine komplexe Reaktionskaskade. Der resultierende Ligand bindet an Endothiapepsin durch eine *induced-fit* Adaption und nutzt beachtliche elektrostatische Wechselwirkungen bei seiner Bindung im Protein aus (**Abbildung 9.5**).

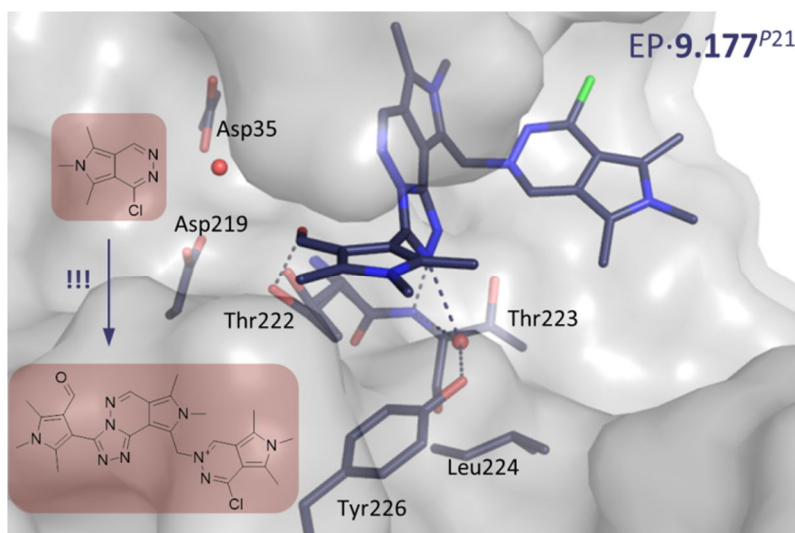


Abbildung 9.5. Bindungsmodus der ursprünglich aufgenommenen Verbindung **177** im Komplex mit Endothiapepsin (EP-9.177^{P21}, PDB ID: 5LWR). Das eigentliche Fragment **177** wurde in der *Soaking*-Struktur nicht identifiziert. Vielmehr wurde ein anderes Molekül, das durch eine komplexe Reaktionskaskade entsteht, eindeutig identifiziert. Die Strukturformel des Fragments **177** und die entstandene Molekülformation sind in der Abbildung rot hinterlegt. Farbcode: Kohlenstoff dunkelblau, Sauerstoff rot, Stickstoff blau, Chlor grün, lösungsmittelzugängliche Oberfläche grau. H-Brücken sind als dunkelblaue gestrichelte Linien dargestellt (Distanzen: zwischen 2.7 und 3.4 Å).

Dieses Beispiel ist vor allem deshalb eindrucksvoll, da nur die Strukturinformation durch Röntgenkristallographie und nicht die primären biophysikalischen *Screening*-Verfahren das Fragment **177** als falsch-positiven Treffer identifiziert hat (detaillierte Informationen sind in dem Artikel und der zugehörigen Supporting Information Cramer *et al.* (2016) zu finden). Aufgrund der zunehmenden technischen Entwicklungen sollte die Röntgenkristallographie daher als ernstzunehmende Alternative zu den etablierten initialen *Screening*-Verfahren in Erwägung gezogen werden.

10. Vergleichender Überblick, Ausblick und Zusammenfassung

10.1 Vergleichender Überblick

Die vorliegende Dissertation behandelt verschiedene Aspekte des strukturbasierten Wirkstoffdesigns. Der Schwerpunkt lag dabei auf der Entwicklung, Charakterisierung und Optimierung von Inhibitoren der tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT) anhand von pK_a -Bestimmungen, PAMPA-Messungen, nativer Massenspektroskopie, kinetischen Radioaktivmessungen, ITC-Titrations und schlussendlich von Röntgenkristallstrukturen. Dem Enzym TGT wird eine Schlüsselrolle in der Pathogenität von *Shigellen*, den Verursachern der Bakterienruhr, zugesprochen (**Kapitel 1**). Die TGT katalysiert einen Basenaustausch zum Erhalt von modifizierter tRNA, die essentiell für die Produktion vieler Virulenzfaktoren der *Shigellen* ist. Die entzündliche Darmerkrankung Bakterienruhr ist weltweit verbreitet, jedoch wird von erhöhten Fallzahlen und Todesopfern vor allem in Entwicklungsländern berichtet. Die Therapie der entzündlichen Darmerkrankung mit gängigen Antibiotika ist aufgrund von steigenden Resistenzen der *Shigellen* gegenüber diesen Medikamenten erschwert und verlangt dringend neue wirksame Substanzen zur Behandlung. Die erste röntgenkristallographische Aufklärung der bakteriellen *Zymomonas mobilis* TGT im Jahr 1996 lieferte die Grundlage für die strukturbasierte Wirkstoffentwicklung eines TGT-Inhibitors.

Im Jahr 2007 wurde von der Arbeitsgruppe Klebe in Kooperation mit der Arbeitsgruppe Diederich (ETH Zürich) das vielversprechende und hoch affine *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst entwickelt, welches sich von der Purinbase Guanin ableitet. Die Base Guanin wird durch die modifizierte Base preQ₁ TGT-katalysiert ausgetauscht. Mit diesem im aktiven Zentrum bindenden Anker-Molekül ist es möglich, durch das Anfügen von Substituenten an C(2) oder C(4) die benachbarten Seitentaschen (Ribose-33/Uracil-33 oder Ribose-34/Phosphat-35) zu adressieren (**Abbildung 10.1**). In **Kapitel 2** wird eine Studie beschrieben, die sich der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche widmet. Die genannte Subtasche wurde mit ungeladenen Furanosyl-C(4)-Substituenten adressiert, um dort das vorliegende

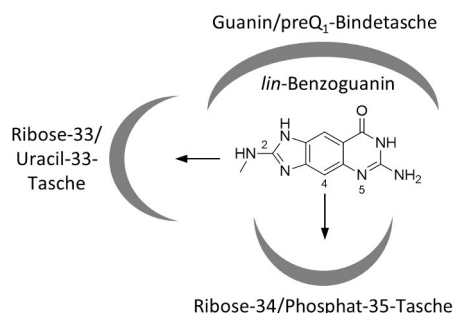


Abbildung 10.1. Schematischer Überblick des aktiven Zentrums der TGT

Wassernetzwerk ladungsneutral zu verdrängen. Dabei binden die Furanosyl-Substituenten räumlich gesehen in einer vergleichbaren Region wie die Phosphatgruppe-35 des natürlichen tRNA-Substrats. Dies lässt den Rückschluss zu, dass Furanoside als mögliche Surrogate für die Adressierung von Phosphat-bindetaschen geeignet sind.

Durch zahlreiche Studien war zuvor gezeigt worden, dass die TGT nur als Homodimer in einem Verhältnis 1:1 (Dimer : tRNA) das natürliche tRNA-Substrat modifiziert. Die Kontaktfläche der beiden TGT-Monomere, die das Dimer bilden (*Interface*), liegt in unmittelbarer Nähe zu der genannten Ribose-34/Phosphat-35-Tasche. Bei den Furanosyl-substituierten Verbindungen aus **Kapitel 2** fiel in den Kokristallstrukturen auf, dass eine zusätzliche Methylgruppe an einem Liganden dazu führte, dass der eingenommene Bindungsmodus dem Ligand-Substituenten erlaubt tiefer in die Ribose-34/Phosphat-35-Tasche einzudringen. Infolge erschienen Teile des angrenzenden $\beta 1\alpha 1$ -Loops sowie die Helix $\alpha 1$ als kristallographisch nicht mehr auflösbar. Das *Loop-Helix Motiv* (bestehend aus $\beta 1\alpha 1$ -Loop und Helix $\alpha 1$) dient dazu, einen hydrophoben *Hotspot*, der aus vier aromatischen Aminosäuren besteht und maßgeblich zur Dimerstabilität beiträgt, vor dem Einfluten von Wassermolekülen zu schützen. Diese Funktion ist durch Bindung des methylierten Furanosyl-Derivats nicht mehr gegeben. Gleichzeitig ist dies mit einer kompletten Änderung der thermodynamischen Signatur dieser methylierten Verbindung im Vergleich zu der nicht methylierten Variante verbunden. Zuvor wurde mit einer anderen Ligandenserie, die rigide nadelartige Substituenten in Richtung des *Loop-Helix Motivs* orientierten, genau dieser Zusammenbruch des *Loop-Helix Motivs* erzielt. Im Vergleich zu diesen nadelartigen Verbindungen ist das eingangs erwähnte, methylierte Furanosyl-Derivat jedoch wesentlich kürzer und adressiert in der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche den hydrophoben Bereich (Leu68, Val45, Val282) und nicht direkt das genannte Motiv. Durch Umlagerungen der hydrophoben Reste wird allerdings die gleiche strukturelle Störung induziert; der Zusammenbruch des *Loop-Helix Motivs*. Da diese strukturelle Neuausrichtung nur in Kokristallstrukturen sichtbar wird, wurden in einer vertieften Studie (**Kapitel 3**) bereits charakterisierte Liganden kokristallisiert, bei denen zuvor nur eine durch die *Soaking*-Methode erhaltene Kristallstruktur vorlag. Die anschließende Analyse der neu erhaltenen Kokristallstrukturen offenbarte, dass die Liganden zum Teil komplett unterschiedliche Bindungsmodi aufwiesen als dies zuvor in den *Soaking*-Kristallstrukturen zu beobachten war. Hinzu kam, dass bis auf eine Verbindung alle neu kokristallisierten Liganden das *Loop-Helix Motiv* indirekt durch Adressierung des hydrophoben Bereichs der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche beeinträchtigen, was in den *Soaking*-Strukturen nicht sichtbar war. Daher ist bei der Analyse von Kristallstrukturen stets das verwendete Kristallisationsprotokoll bei der Strukturinterpretation zu berücksichtigen. Native MS Messungen der untersuchten Liganden ergaben erhöhte Monomeranteile in der Gasphase, was die Bestätigung lieferte, dass die Störung des *Loop Helix Motivs* in den Kristallstrukturen mit einer Destabilisierung des TGT-Homodimers verbunden ist. Bei einer weiteren Verbindung wurde eine bis zu diesem Zeitpunkt nicht bekannte Neuausrichtung der TGT-Monomere festgestellt (*verdrehtes* Dimer). Diese, durch den Liganden induzierte *verdrehte* Dimerpackung ist aus strukturellen Gründen nicht mehr in der Lage, das natürliche tRNA-Substrat zu modifizieren.

Dies ermöglicht daher einen neuen Inhibitionsmechanismus zu verfolgen: die Inhibition durch Stabilisierung einer nicht-katalytischen dimeren Quartärstruktur.

Die untersuchten Verbindungen aus **Kapitel 2, 3, 6 und 7** basieren auf dem *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst, welches in PAMPA-Messungen keine ausreichende Membranpermeabilität aufgrund seines polaren Charakters und der Protonierung des N(5)-Stickstoffs aufweist. Deswegen wurde ein *Prodrug*-Ansatz mit verschiedenen Carbamat-Substituenten untersucht (**Kapitel 4**). Erstmals konnten Verbindungen erhalten werden, die die künstliche Membran des PAMPA Assays durchdringen. Die Carbamat-Gruppe wurde aufgrund ihrer häufigen Anwendung als *Prodrug*-Funktionalität gewählt. Durch die Variation der chemischen Zusammensetzung der Carbamat-Substituenten konnte ein breiter Bereich von $\text{clogD}_{7.4}$ -Werten und damit unterschiedlicher Lipophilie abgedeckt und getestet werden. Damit es zu einer Hemmung der TGT in *Shigellen* kommen kann, müssten Inhibitoren zunächst die Zellmembranen der *Shigellen* und die der humanen Endothelzellen überwinden. Die Ergebnisse aus dieser *Prodrug*-Studie lassen die Testung unserer entwickelten Inhibitoren in Zell-basierten *in vivo* Shigellen-Invasionsassays wieder vielversprechender aussehen. Zusätzlich konnten von den untersuchten *Prodrug*-Verbindungen zwei in Kokristallstrukturen identifiziert werden. Beide Liganden binden trotz des angefügten Carbamat-Substituenten an die TGT. Aufgrund der Ausrichtung der Substituenten könnten sie weiterhin als Ausgangspunkt dienen, um die Ribose-34/Phosphat-35-Tasche zu adressieren.

Eine weitere Studie konzentrierte sich nicht auf die Affinitätssteigerung von Inhibitoren, sondern auf die Untersuchung der Guanin-34/preQ₁-Bindetasche, an der Stelle, an der die Basenaustauschreaktion stattfindet (**Kapitel 5**). Es sollten die Einflüsse der Aminosäuren Asp156, Gln203 und Gly230 auf die Bindungsaffinitäten der untersuchten Liganden festgestellt werden. In einer Art retrospektiven Arbeit wurde anhand von Benzimidazol-basierten Inhibitoren eine zuvor nur durch eine MD-Simulation prognostizierte transiente Taschenerweiterung erstmals durch Kokristallstrukturen experimentell bestätigt. Vor Beginn dieser Arbeit wurde die Guanin-34/preQ₁-Bindetasche der TGT aufgrund einer Vielzahl von Kristallstrukturen als in diesem Bereich wenig adaptiv angesehen. Doch sowohl Hydrazid-, als auch Guanidin-Gruppen, angefügt an einem Benzimidazol-Grundkörper können aufgrund eines sterischen Drucks auf Asp156 und der Solvatisierung von Gln203 und Gly230 Teile des $\beta 4\alpha 4a$ -Loops (Glu157 – Tyr161) oberhalb des genannten Aspartats eine strukturelle neue Ausrichtung induzieren. Dies führt dazu, dass sich die Guanin/preQ₁-Bindetasche erweitert, bzw. dass ein neuer transienter Hohlraum in den Kokristallstrukturen erkennbar wird. Die Guanidin-basierten Benzimidazole dienen nun als Ausgangspunkt für weitere Designzyklen zur Adressierung der neuen transienten Taschenerweiterung.

Die Derivatisierung an C(4) oder C(5) der Guanidin-substituierten Benzimidazole könnte die Besetzung der Taschenerweiterung ermöglichen und so neue Affinitätspotentiale nutzen.

In **Kapitel 6** wurden C(2)-Monosaccharid-Derivate des *lin*-Benzoguanins untersucht, die die Lösungsmittel-exponierte Ribose-33/Uracil-33-Tasche adressieren. Zwei von insgesamt sechs geplanten Verbindungen zeigten, dass ihre thermodynamischen Profile zwar annähernd identisch sind, die Bindungsmodi der Monosaccharid-Substituenten jedoch stark unterschiedlich ausfallen. Die vorgefundenen Wasserstrukturen in der untersuchten Seitentasche sind wiederum nahezu identisch. Bei einer Verbindung konnte festgestellt werden, dass trotz Ausbildung zweier zusätzlicher H-Brücken zu Tyr106 und Arg286 in dieser Lösungsmittel-exponierten Bindetasche der Ligand nicht höher affin ist, als ein zweiter, der diese Wechselwirkungen nicht eingeht. Dies bestätigt, dass von Liganden ausgebildete H-Brücken zum Protein in einer lösungsmittelzugänglichen Tasche nicht immer vorteilhaft für die Bindungsaffinität sind. Im Gegensatz zu den C(4)-Monosaccharid-substituierten Liganden, die die Ribose-34/Phosphat-35-Tasche adressieren und dort strukturell im Bereich der Phosphatgruppe-35 binden (**Kapitel 2**), binden die Monosaccharide aus **Kapitel 6** nicht mit der in der Tasche befindlichen Phosphatgruppe deckungsgleich. Im Vergleich zu dem unsubstituierten 2-Amino-*lin*-Benzoguanin konnte jedoch durch das Anfügen der Monosaccharide eine von bis zum Faktor 3.7 verbesserte Bindungsaffinität erzielt werden.

In einer Studie, die auf den Erkenntnissen aus **Kapitel 3** aufbaut, wurden drei weitere Verbindungen entwickelt, die den hydrophoben Bereich der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche adressieren sollen (**Kapitel 7**). Die kinetische, thermodynamische und röntgenkristallographische Analyse der neu synthetisierten Verbindungen bestätigen die gewählte Designstrategie. Die untersuchten Monosaccharid-Verbindungen zeigen alle in gleichem Ausmaß, dass deren Bindung überwiegend entropisch getrieben und die Protein-Protein-Interaktion des TGT-Homodimers gestört wird. Bei zwei Verbindungen konnten Kokristallstrukturen der Raumgruppe *C2* und *P2₁* erhalten werden, die das konventionelle aber auch das *verdrehte* Dimer nachweisen. In den jeweiligen Kokristallen der Raumgruppe *C2* wurde erstmals festgestellt, dass durch die Ligandbindung die bisher als rigide angenommene Zink-Koordination beeinträchtigt werden kann. Durch Umlagerungen und Neuausrichtungen von Aminosäuren wird die relativ weit vom aktiven Zentrum entfernte Zink-Koordination gestört. Des Weiteren konnte bei Trp326', das durch Ausbildung einer H-Brücke zu Met93 im konventionellen Dimer deutlich zu dessen Stabilität beiträgt, in den untersuchten Kokristallen der Raumgruppe *C2* ein Umklappen der Trp326'-Indol-Seitenkette festgestellt werden.

Da die gleiche Geometrie auch bei den korrespondierenden Kokristallstrukturen in der Raumgruppe $P2_1$ (*verdrehtes* Dimer) zu erkennen ist und die Zink-Koordination gestört wird, ist zu vermuten, dass die aufgefundene Geometrie des Proteins in den Kokristallstrukturen der Raumgruppe $C2$ einem initialen Schritt zur Transformation in die neue *verdrehte* Dimerpackung entspricht. Diese Ergebnisse zeigen, dass beide Verbindungen die TGT in ihrer Dimerisierung stören. Gleichzeitig bedeutet es, dass das Enzym in der Lage ist, eine alternative *verdrehte* dimere Quartärstruktur zu bilden, bzw. dass ein durch die Liganden induziertes Gleichgewicht von konventionellem und *verdrehtem* TGT-Dimer vorliegen muss. Eine physiologische Rolle des *verdrehten* Dimers ist nicht auszuschließen.

In **Kapitel 8** wird ein weiteres Projekt der TGT beschrieben. Dieses Projekt handelt von einem Nukleosidderivat, welches als mögliches Übergangszustand-Analogon die Basenaustauschreaktion der TGT inhibiert. Der entwickelte Deazaguanin-basierte Inhibitor stellt eine neue Verbindungsklasse und mögliche Leitstruktur gegenüber den etablierten *lin*-Benzoguaninen dar. Aufgrund der bekannten vorteilhaften physikochemischen Eigenschaften von Nukleosidderivaten, könnte die neue Verbindungsklasse die etablierten *lin*-Benzoguanine in Zukunft ablösen.

In den letzten Jahren ist die Untersuchung zunehmend kleinerer Moleküle (Fragmente), die an Zielenzyme binden, in den Fokus der Leitstruktursuche gerückt. Nach Identifizierung geeigneter „Start“-Fragmente können anschließend diese systematisch erweitert werden, um ihre Bindungsaffinität und Selektivität zu steigern. In einer ausgedehnten kristallographischen Studie wurde die *in-house*-Fragmentbibliothek der AG Klebe durch *Soaking*-Kristallstrukturen an das Zielenzym Endothiapepsin, einer Aspartylprotease, analysiert. Von 361 *Soaking*-Kristallstrukturen wurden 71 Komplexstrukturen erhalten, bei denen durch zum Teil mehrfaches Auftreten eines Fragments in dem Protein 86 individuelle Bindungsmodi identifiziert wurden (Trefferquote 20%). Von diesen Kristallstrukturen wurden vom Autor der vorliegenden Dissertation 35 Datensätze untersucht. Daraus resultierten 6 *Soaking*-Kristallstrukturen mit Fragmentbindung, die verfeinert wurden und zur Analyse beigetragen haben (Trefferquote 17%; **Kapitel 9**). Anhand der strukturellen Informationen wurden bisher fünf Publikationen aus dieser Zusammenarbeit veröffentlicht. Unter anderem war es möglich, neue funktionelle Gruppen, die die katalytische Diade des Endothiapepsin-Enzyms adressieren, zu identifizieren. Durch 45 Fragmente, die außerhalb der katalytischen Diade binden, wurden drei *Hotspots* erkennbar. Diese bieten Optimierungskonzepte an, aus denen größere Liganden mit höherer Aktivität und Selektivität entstehen könnten.

Bei der Fragment-basierten Leitstruktursuche werden in der Regel, bevor die Treffer röntgenkristallographisch untersucht werden, zwei oder mehrere biophysikalische Methoden zum *Screening* einer Fragmentbibliothek als Filter genutzt. Der Vergleich der 71 Treffer der kristallographischen Studie und die Ergebnisse aus sechs biophysikalischen Methoden zeigte alarmierend, dass 44% der kristallographischen Fragment-Treffer in keinem der verwendeten biophysikalischen *Screening*-Verfahren detektiert wurde.

Des Weiteren hätte eine Filter-Kaskade aus zwei oder mehreren biophysikalischen Methoden mindestens 73% der erhaltenen kristallographischen Treffer nicht erkannt. Daraus kann geschlossen werden, dass die in der Regel verwendeten *Screening*-Verfahren die Anzahl an möglichen Röntgenkomplexstrukturen im vorliegenden Fall deutlich verringert hätten. Nur der direkte Einsatz der Röntgenkristallographie zum *Screening* von Fragmentbibliotheken ermöglicht eine erschöpfende Trefferanzahl, die als Quelle zur *Hit-to-lead* Entwicklung genutzt werden kann.

Es ist in der Röntgenkristallstruktur üblich nur in der Elektronendichte auf der Basis der Phasen einer anderen gut aufgelösten Struktur nach einem gebundenen Fragment zu suchen. Im Zuge der Verfeinerung der 361 Fragment-Kristallstrukturen wurde jedoch offensichtlich, dass 25% der 71 Fragment-Treffer in dieser nur anfänglich verfeinerten Elektronendichte nicht eindeutig detektierbar gewesen wären. Daraufhin wurde ein standardisiertes Verfeinerungsprotokoll entwickelt, welches die Identifizierung von Fragmenten in Kristallstrukturen optimiert und die Identifikation der 25% nicht in der anfänglich verfeinerten Elektronendichte sichtbaren Fragmente gewährleisten würde.

Ein Fragment, das in allen verwendeten biophysikalischen Filter-Methoden als das potenteste von allen aufgefallen war, konnte durch die *Soaking*-Kristallstruktur als falsch-positiver Treffer aufgedeckt werden. Dieses als falsch-positiver Treffer kategorisierte Fragment zeigt seine biologische Aktivität in erster Linie durch chemische Umsetzung zu einem auf ca. das Dreifache vergrößerte Reaktionsprodukt über eine komplexe Reaktionskaskade. Demnach konnte das ursprüngliche Fragment nicht in der Kristallstruktur, sondern das gebildete Reaktionsprodukt, festgestellt werden. Dies unterstreicht erneut, dass die Röntgenkristallographie als erstes Verfahren und nicht erst als *follow-up* Verfahren zur Validierung von Ergebnissen biophysikalischer Methoden herangezogen werden sollte.

10.2 Ausblick

Das System der *Z. mobilis* TGT stellt ein gut exprimierbares und kristallisierbares Protein dar, welches aufgrund der Funktion der TGT in *Shigellen* gleichzeitig ein Zielmolekül darstellt, um die entzündliche Darmerkrankung Bakterienruhr zu therapieren, was die ansteigende Resistenzentwicklung von *Shigellen* gegenüber etablierten Antibiotika möglicherweise reduzieren könnte. Anhand der Erkenntnisse, die durch diese Dissertation erhalten, bzw. bestätigt werden konnten, können Aspekte des strukturbasierten Wirkstoffdesigns wie die Entwicklung von Phosphatmimetika, Besetzung von transienten Seitentaschen und schließlich von neuartigen Inhibitionsmechanismen studiert und weiter entwickelt werden.

Zukünftige Design-Strategien könnten zum einen die Membranpermeabilität der *lin*-Benzoguanine durch Testung anderer *Prodrug*-Strategien noch weiter verbessern oder eine Verbindungsklasse entwickeln, die ähnlich potent die TGT inhibiert, allerdings mit dem Vorteil einer direkten Membrangängigkeit. Es sollte versucht werden, die transiente Taschenerweiterung der Guanin/preQ₁-Bindetasche zu besetzen, um so neue Affinitätspotentiale für aktive Inhibitoren zu nutzen. Die Erkenntnis, dass durch die Adressierung des hydrophoben Bereichs der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche von Ligand-Substituenten indirekt die Dimerisierung der TGT gestört und sogar die Quartärstruktur umgewandelt werden kann, ermöglicht letztendlich neuartige PPI-Inhibitoren zu entwickeln, die das neu entdeckte, potentiell katalytisch inaktive, *verdrehte* Dimer stabilisieren.

Zahlreiche Kristallstrukturen unterstreichen, dass die gewonnenen strukturellen Informationen vornehmlich durch Kokristallisation erhalten werden sollten. Nur in den Kokristallstrukturen und nicht in *Soaking*-Strukturen, kann das ganze Spektrum von strukturellen Änderungen aufgrund von Ligandbindung in dem Protein vorgefunden werden. Es konnte gezeigt werden, dass kleinste Änderungen am Molekül, wie das Einfügen von Methylgruppen oder die Ringerweiterung von fünf auf sechs Glieder, nicht nur die Änderung des Bindungsmodus, sondern auch größere strukturelle Änderungen des Proteins, Dimer-störende Eigenschaften, als auch bemerkenswerte Änderungen des thermodynamischen Profils, nach sich ziehen können.

Erste weiterentwickelte Inhibitoren konnten in **Kapitel 7** beschrieben werden, die ebenfalls durch indirekte Verdrängung des $\beta 1\alpha 1$ -Loops die Dimerisierung der TGT stören. Zukünftige Liganden sollten zum einen die Ausrichtung des $\beta 1\alpha 1$ -Loops auf gleiche Weise stören und zusätzlich die neue *verdrehte* dimere Quartärstruktur der TGT durch einen Substituenten stabilisieren. Denkbar wäre es, *lin*-Benzoguanine zu entwickeln, die durch ihren C(4)-Substituenten zum einen die *verdrehte* Dimerpackung induzieren und zum anderen durch einen an N(3) angefügten Substituenten mit Glu339', das in dem *verdrehten* Dimer Teil des aktiven Zentrums ist, polare Wechselwirkungen eingeht.

Der Einfluss auf die Dimerstabilität wurde bisher durch native Massenspektroskopie (nanoESI-MS) bestätigt. Diese Technik diskriminiert allerdings nur zwischen monomerer und dimerer Form in der Gasphase. Sie kann jedoch nicht zwischen verschiedenen dimeren Packungen unterscheiden. Deswegen sollte in Zukunft das Einbringen einer ^{19}F -NMR sensitiven Sonde in das TGT System versucht werden. Dies könnte Einblicke erlauben, in welcher dimeren Form die TGT in Lösung tatsächlich vorliegt.

Die Erkenntnisse aus dem röntgenkristallographischen *Screening* der *in-house*-Fragmentbibliothek der AG Klebe, lassen eine Vielzahl an möglichen Leitstrukturoptimierungen, auch außerhalb des aktiven Zentrums, zu. Die Etablierung eines standardisierten und automatischen Verfeinerungsprotokolls und die stete Weiterentwicklung der Messmethodik an Synchrotrons beschleunigen den Prozess der Röntgenkristallographie. Aus diesem Grund und der erschöpfenden Trefferanzahl aus unserem röntgenkristallographischen *Screening*, sollte in Zukunft die Röntgenkristallographie schon direkt und nicht erst als *follow-up* Validierung von Treffern aus biophysikalischen Filter-Methoden genutzt werden. Hinzukommt, dass die strukturelle Information sofort mögliche falsch-positive Treffer identifizieren und zwischen *active-site* bzw. *remote* bindenden Fragmenten diskriminieren kann.

10.3 Zusammenfassung - Deutsche Fassung

Das Ziel dieser Dissertation war das strukturbasierte Design und die Charakterisierung von Inhibitoren der tRNA-Guanin-Transglycosylase (TGT). Für die ausführliche Untersuchung der entwickelten Liganden wurden neben der strukturgebenden Röntgenkristallographie enzymkinetische Messungen, ITC-Titrationsen, native Massenspektroskopie, PAMPA-Messungen und pK_a -Wert-Bestimmungen genutzt.

Das Zielenzym TGT hat eine essentielle Bedeutung für die molekulare Pathogenese der entzündlichen Darmerkrankung Bakterienruhr, die durch *Shigellen* verursacht wird. Der Einbau modifizierter Basen in die tRNA ist entscheidend für die Pathogenitätsentwicklung der *Shigellen*. Die TGT tauscht dazu die Purinbase Guanin in der Wobble-Position-34 von tRNAs^{Asn, Asp, His, Tyr} durch die modifizierte Base preQ₁ aus. Die von den Purinbasen abgeleiteten *lin*-Benzoguanin Inhibitoren binden im aktiven Zentrum der Basenaustauschreaktion. Durch Anfügen von Substituenten an C(2) bzw. C(4) können die benachbarten Ribose-33/Uracil-33- und Ribose-34/Phosphat-35- Seitentaschen adressiert werden.

In zwei Studien wurden die Wassernetzwerke der genannten Seitentaschen ladungsneutral durch Monosaccharid-Substituenten der *lin*-Benzoguanin Inhibitoren adressiert und verdrängt (**Kapitel 2 & 6**). Dabei binden die C(4)-Furanosyl-Substituenten räumlich gesehen in einer vergleichbaren Region wie die Phosphatgruppe-35 des natürlichen tRNA-Substrats. Dies lässt den Rückschluss zu, dass Furanoside als mögliche Surrogate für die Adressierung von Phosphatbindetaschen geeignet sind.

Da die TGT nur als Homodimer das natürliche tRNA-Substrat in einem Verhältnis 1:1 (Dimer : tRNA) modifiziert, kommen als Inhibitionsmechanismen sowohl die Blockierung des aktiven Zentrums, als auch die Störung der dimeren Quartärstruktur der TGT, in Frage. Die Kontaktfläche der zwei TGT-Monomere (*Interface*) liegt in unmittelbarer Nähe zu der Ribose-34/Phosphat-35-Tasche. Bei der Analyse der Kokristallstrukturen der C(4)-Furanosyl-substituierten Inhibitoren fiel auf, dass durch Adressierung des hydrophoben Bereichs der Seitentasche ein angrenzendes *Loop-Helix Motiv* in seiner geometrischen Integrität gestört wird. Diese Störung ist mit Umlagerungen von bis zu 20 Aminosäuren verbunden. Da dieses Motiv entscheidend zur Dimerstabilität beiträgt und die Umlagerungen nur in Kokristallstrukturen auftreten, wurden in einer vertieften Studie bereits charakterisierte Liganden kokristallisiert, von denen zuvor nur eine durch die *Soaking*-Methode erhaltene Kristallstruktur vorlag (**Kapitel 3**). Die Analyse dieser Kokristallstrukturen offenbarte zum einen andere Bindungsmodi als in den *Soaking*-Kristallstrukturen und bestätigte zum anderen weitere Liganden, die das *Interface* der TGT stören. Die Dimer-destabilisierende Wirkung dieser Liganden wurde durch native Massenspektroskopie bestätigt. Ein Ligand induziert durch seine Bindung eine neuartige Ausrichtung des TGT-Dimers (*verdrehtes Dimer*), welche offensichtlich aufgrund der verdrehten Neuausrichtung nicht mehr katalytisch aktiv sein kann.

Dies ermöglicht in zukünftigen Designzyklen einen neuen Inhibitionsmechanismus zu verfolgen: Blockade der Enzymfunktion durch Stabilisierung eines katalytisch inaktiven Dimers. In einer Folgestudie konnten drei Inhibitoren charakterisiert werden, die ebenfalls die Dimerisierung der TGT stören (**Kapitel 7**). Zwei dieser Verbindungen kokristallisieren sowohl in dem konventionellen, als auch in dem *verdrehten* Dimer.

Eine weitere Studie verfolgte den *Prodrug*-Ansatz (**Kapitel 4**). Da die *lin*-Benzoguanin-Inhibitoren nicht membrangängig sind, wurde das Grundgerüst mit unterschiedlichen Carbamat-Substituenten versehen. Infolge konnten PAMPA-Messungen zum ersten Mal membrangängige Liganden der TGT bestätigen. Des Weiteren wurden von zwei Carbamat-Derivaten Kokristallstrukturen erhalten, die aufgrund der Ausrichtung der Substituenten die Ribose-34/Phosphat-35-Tasche adressieren.

In einer Art retrospektiven Arbeit wurden die Bindungsbeiträge der Aminosäuren der Guanin-34/preQ₁-Tasche auf die Affinitäten der untersuchten Liganden aufgeklärt (**Kapitel 5**). Anhand von Benzimidazol-Derivaten wurde eine zuvor durch eine MD-Simulation prognostizierte Taschenerweiterung erstmals in Kokristallstrukturen experimentell bestätigt. Sowohl Hydrazid-, als auch Guanidin-Substituenten des Benzimidazol-Grundkörpers, stabilisieren aufgrund ihres sterischen Drucks auf Asp156 und der Solvatisierung von Gln203 und Gly230 die transiente Taschenerweiterung. In zukünftigen Designzyklen könnten die Guanidin-Benzimidazole derivatisiert werden, um den neuen Hohlraum zu adressieren und so neue Affinitätspotentiale zu nutzen.

Ein weiteres Projekt verfolgte die Charakterisierung eines Nukleosidderivats, welches als mögliches Übergangszustand-Analogon die Basenaustauschreaktion der TGT inhibiert (**Kapitel 8**). Der entwickelte Deazaguanin-basierte Inhibitor stellt eine neue Verbindungsklasse und mögliche Leitstruktur dar, die in Zukunft die etablierten *lin*-Benzoguanine ablösen könnte.

In einem größer angelegten Projekt wurde von neun Kristallographen der AG Klebe die *in-house* Fragmentbibliothek durch *Soaking*-Kristallstrukturen an das Zielenzym Endothiapepsin röntgenkristallographisch durchgemustert (**Kapitel 9**). Von 361 *Soaking*-Kristallstrukturen wurden 71 Komplexstrukturen (Trefferquote 20%) erhalten. Im Zuge dieses Projektes wurde auch ein standardisiertes Verfeinerungsprotokoll entwickelt, welches die Identifizierung von Fragmenten in Kristallstrukturen optimiert und automatisiert. Aufgrund der strukturellen Information der Fragmente in den Kristallstrukturen konnten zum einen neue funktionelle Gruppen zur Adressierung der katalytischen Diade, als auch drei *Hotspots* abseits des aktiven Zentrums, identifiziert werden. Neben der Demaskierung eines falsch-positiven Treffers aus biophysikalischen *Screening*-Verfahren, wurde auch offensichtlich, dass die in der Praxis häufig verwendeten biophysikalischen Methoden zum *Vor-Screening* von Fragmentbibliotheken die Anzahl der Treffer und somit mögliche Röntgenkomplexstrukturen nicht unbedingt erhöht sondern gegebenenfalls reduziert.

Daher sollte die röntgenkristallographische Untersuchung unmittelbar und nicht erst als *follow-up* Verfahren zur Validierung von Ergebnissen biophysikalischer Methoden herangezogen werden.

10.4 Summary – English Version

The goal of this thesis was structure-based design and characterization of inhibitors of tRNA-guanine transglycosylase (TGT). For the detailed investigation of the developed ligands, besides structural studies by X-ray crystallography, enzyme kinetic measurements, ITC titrations, native mass spectroscopy, PAMPA measurements and pK_a determination were performed.

The target enzyme TGT is essential for the molecular pathogenesis of the inflammatory disease Shigellosis, which is caused by *Shigella* spp. Incorporation of modified nucleobases into tRNA are required to develop pathogenicity of *Shigella*. Therefore, TGT replaces the purine base guanine in the wobble position-34 of tRNAs^{Asn,Asp,His,Tyr} by the modified base preQ₁. The *lin*-benzoguanine inhibitors derived from purine bases bind in the active site of the base exchange reaction. By attaching substituents to C(2) or C(4), the adjacent specificity pockets ribose-33/uracil-33 and ribose-34/phosphate-35 can be addressed, respectively.

In two studies, the water clusters of the named pockets were addressed and displaced by charge-neutral monosaccharide substituents of the *lin*-benzoguanine inhibitors (**Chapter 2 & 6**). Thereby, the C(4)-furanosyl-substituents bind in comparable region as the phosphate group-35 of the natural tRNA substrate. This implies that furanosides might be a surrogate to target phosphate binding sites.

As TGT modifies the natural tRNA substrate only as a homodimer in a ratio of 1 : 1 (dimer : tRNA), both, blocking of the active site and disturbing the dimeric quaternary structure of the TGT can be considered as inhibition mechanisms. The contact surface of the two TGT monomers (interface) is in close proximity to the ribose-34/phosphate-35 pocket. Upon analyses of the co-crystal structures of the C(4)-furanosyl-substituted inhibitors it became obvious, that by addressing the hydrophobic region of the side pocket, an adjacent *loop helix motif* was disturbed and lost its geometric integrity. This disturbance is associated with rearrangements of up to 20 amino acids. As this motif decisively contributes to the dimeric stability and rearrangements are only visible in co-crystal structures, previously characterized ligands have been newly co-crystallized in an elaborate study, as only crystal structures obtained by the soaking method were available (**Chapter 3**). The analysis of these co-crystal structures revealed on the one hand different binding poses compared to the soaking structures and on the other hand confirmed further ligands that interfere with TGT interface. The dimer-disturbing effect of these ligands has been confirmed by native mass spectroscopy.

One ligand caused a complete rearrangement of TGT monomer units (*twisted dimer*), leading to an arrangement obviously no longer catalytical active with twisted subunit packing. This provides the option for a new mechanism of action in future design cycles: the inhibition by stabilizing a catalytically inactive dimeric form. In a follow-up study, three inhibitors could be characterized, which also interfere with the dimerization of TGT (**Chapter 7**). Two of these compounds co-crystallized in both, the conventional and the *twisted* dimer, respectively.

Another study followed a prodrug approach (**Chapter 4**). As the *lin*-benzoguanine inhibitors do not diffuse through membranes, the scaffold was modified with different carbamate substituents. As a result, PAMPA measurements confirmed ligands of TGT that are membrane-permeable for the first time. Furthermore, from two carbamate derivatives co-crystal structures could be obtained, which due to surprising orientation of the substituents address the ribose-34/phosphate-35 pocket.

In a kind of retrospective work the impact of amino acids flanking the guanine-34/preQ₁ site on binding affinity of the examined ligands were studied (**Chapter 5**). Based on benzimidazole derivatives, a cavity expansion, previously predicted by a MD-simulation, has been experimentally confirmed by co-crystal structures for the first time. Both, hydrazide and guanidine groups attached to the benzimidazole scaffold stabilize a transient cavity opening, due to steric impact on Asp156 and solvation of Gln203 and Gly230. In future design cycles, guanidine-benzimidazoles can be derivatized to address the new pocket and thus exploit new affinity options.

Another project followed the characterization of a nucleoside derivative, which inhibits as a putative transition state analogue the base exchange reaction of TGT (**Chapter 8**). The developed deazaguanine-type inhibitor represents a new class of compounds and suggests a possible lead structure that could replace the established *lin*-benzoguanines in the future.

In a large-scale project, nine crystallographers from the group of Prof. Klebe scanned the *in-house* fragment library by soaking crystal structures of the target enzyme Endothiapepsin (**Chapter 9**). From 361 soaking crystal structures 71 complex structures (hit rate 20%) were obtained. Within the framework of this project, also a standardized refinement-protocol was developed, which optimizes and automatizes the identification of fragments in crystal structures. Based on the structural information of the fragments in the crystal structures new functional groups to address the catalytic dyad, as well as three hotspots remote from the active site were identified. In addition to unmasking false-positive hit from biophysical screening methods, it became obvious that biophysical methods frequently used to initially screen fragment libraries possibly reduces the number of accessible hits and thus the number of X-ray complex structures. Therefore, X-ray crystallography should be consulted immediately and not only as follow-up validation technique to confirm results of biophysical screenings.

11. Material und Methoden

11.1 Chemikalien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Chemikalien sind in **Tabelle 11.1** aufgeführt.

Tabelle 11.1. Eingesetzte Chemikalien und deren Hersteller.

Name	Hersteller
Acrylamid / Bisacrylamid (30%/0.8%)	ROTH
Agarose	Fluka
Ammoniumperoxodisulfat (APS)	ROTH
Ampicillin	ROTH
Biotinylated thrombin	Novagen
Bromphenolblau	Merck
Chloramphenicol	ROTH
Chloroform:Isoamylalkohol 24:1	ROTH
cOmplete™, EDTA free, <i>Protease inhibitor cocktail tablets</i>	Roche
Coomassie Brilliant Blue R250	ROTH
d-Desthiobiotin	IBA
Dimethylsulfoxid (DMSO) p.a.	ROTH
1,4-Dithiothreitol (DTT)	ROTH
Ethanol 96% p.a.	ROTH
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Merck
Glycerol	Acros Organics
[8- ³ H]-Guanin	Hartmann Analytics
Guanin-HCL	Sigma Aldrich
Hefeextrakt	ROTH
2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoic acid (HABA)	Fluka
2-(4-(2-Hydroxyethyl)-piperazinyl)ethansulfonsäure (HEPES)	ROTH
Isopropyl-β-D-thiogalactopyranosid (IPTG)	ROTH
Magnesiumchlorid Hexahydrat	Merck
6x <i>Mass Ruler Loading Dye</i> (R0621)	Fermentas
β-Mercaptoethanol	Merck
2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure (MES)	ROTH
Methanol p.a.	Fluka
Natriumchlorid	ROTH
Natriumdodecylsulfat	ROTH
Natriumhydroxid	Grüssing
PageRuler™ <i>Prestaint Protein Ladder</i> (SM0671/2)	Fermentas
Pepton aus Casein	ROTH
Phenol:Chloroform:Isoamylalkohol 25:24:1	Sigma Aldrich
Polyethylenglycol MW 8000 (PEG8000)	ROTH
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamide:N,N-Methylenbisacrylamide 37.5:1)	ROTH

11. Material und Methoden

Name	Hersteller
Rotiphorese® 10x SDS-PAGE	ROTH
Rotiszint®eco plus	ROTH
Salzsäure 32%	Grüssing
Silikon (GE Bayer Silicones)	Bayer
SYBR® Safe DNA Gel Färbelösung	Invitrogen
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	ROTH
Trichloressigsäure (TCA)	Fluka
N-(Tris(hydroxymethyl)methyl)glycin (Tricine)	Merck
TEMED	ROTH
Tris(hydroxymethyl)aminomethan (TRIS)	ROTH
Tween20	Sigma Aldrich
TEMED	ROTH

11.2 Geräte

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Geräte sind in **Tabelle 11.2** aufgeführt.

Tabelle 11.2. Eingesetzte Geräte und deren Hersteller.

Gerät	Hersteller
ÄKTA FPLC	GE Healthcare / Amersham Pharmacia Biosciences
Autoklav (Typ FVA2)	Fedegari
Dialysemembran Zellu Trans 4000 – 6000 MWCO	ROTH
Electrophorese Zell OWL EASyCAST™ B1A	Thermo Scientific
EmulsiFlex-C5™	AVESTIN
Feinwaage CP2 P	Sartorius
Feinwaage Type 404/13	Sauter
Nalgene™ Rapid-Flow™ Porengröße 0.2 µM	Thermo Scientific
FiveEasy pH-Meter	Mettler Toledo
Heizrührer IKA-COMBIMAG REG	Janke & Kunkel
Hera Safe Sterilbank	Thermo Scientific
ITC200 Microcalorimeter	GE Healthcare
Microwelle	Siemens
Mikroskop Typ SZ 60	Olympus
Mini-Zentrifuge IKA® mini G	IKA
Nanodrop 2000c Spectrophotometer	Thermo Scientific
NAP™-25 Sephadex Säulen	GE Healthcare
Pipetten	Eppendorf
Q-Sepharose Säule XK26	Amersham Bioscience
Schüttelinkubator Innova 4200	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Innova 4230	New Brunswick Scientific
Schüttelinkubator Innova 43	New Brunswick Scientific
Mini-PROTEAN® Tetra System	BIO-RAD

11. Material und Methoden

Gerät	Hersteller
Speed-Vak Vakuumpumpe DNA mini	Jouan Nordic
Strep-Tactin Superflow Sepharose Säule	IBA
Scintillationszähler Tri-Carb® 1900CA	Packard
Scintillationszähler Tri-Carb® 2810 TR	Perkin Elmer
Thermomixer comfort 2mL	Eppendorf
Ultraschall Bad Elmasonic S10/(H)	Elma
VIVASPIN 2® 30.000 MWCO PES	Sartorius
Vortexer VF1 / VF2	Janke & Kunkel
Waage Typ 572/45	Kern
Zentrifuge Avanti J-10/ J-25	Beckman Coulter
Zentrifuge Biofuge fresco	Heraeus
Zentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Zentrifuge Multifuge 3	Heraeus

11.3 Lösungen, Puffer und Medien

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Lösungen und Puffer sind in **Tabelle 11.3** aufgeführt. Soweit nicht explizit vermerkt, wurde entmineralisiertes Wasser als Lösungsmittel verwendet. pH-Werte wurden mit Natriumhydroxid-Lösung (10 M) und/oder Salzsäure (32% (v/v)) mit dem FiveEasy pH-Meter (Mettler Toledo) eingestellt. Puffer wurden vor Gebrauch frisch hergestellt und steril filtriert (Nalgene™ Rapid-Flow™ Porengröße: 0.2 µM).

Tabelle 11.3. Eingesetzte Lösungen, Puffer, Medien und deren Zusammensetzung.

Name	Zusammensetzung
Ampicillin-Lösung	100 mg·mL ⁻¹ Ampicillin
APS-Lösung	10% (m/v) Ammoniumpersulfat
Assay-Puffer	100 mM HEPES pH 7.3, 20 mM MgCl ₂ , 0.037% (v/v) Tween 20
Chloramphenicol-Lösung	34 mg·mL ⁻¹ Chloramphenicol in Ethanol 96% (v/v)
Coomassie-Blue Entfärbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol
Coomassie-Blue Färbelösung	10% (v/v) Essigsäure, 40% (v/v) Methanol, 1 g·L ⁻¹ Coomassie Brilliant Blau R250
Guanin-Lösung	188 µM Guanin-HCl
HEPES-Lösung	10mM HEPES pH 7.3
Hochsalzpuffer	10 mM TRIS pH 7.8, 1 mM EDTA, 2 M NaCl
ITC Puffer A	50 mM HEPES pH 7.8, 200 mM NaCl, 0.037% (v/v) Tween 20
ITC Puffer B	50 mM TRIS pH 7.8, 200 mM NaCl, 0.037% (v/v) Tween 20
ITC Puffer C	50 mM Tricine pH 7.8, 200 mM NaCl, 0.037% (v/v) Tween 20
IPTG	1 M IPTG
Kristallisationspuffer	100 mM MES pH 5.5, 1 mM DTT, 10% (v/v) DMSO, 13% (m/v) PEG8000
Krypuffer	50 mM MES pH 5.5, 0.5 mM DTT, 0.3 M NaCl, 2% (v/v) DMSO, 4% (m/v) PEG8000, 30% (v/v) Glycerol

11. Material und Methoden

Name	Zusammensetzung
Laemmli-Puffer	0.25 M TRIS pH 8.3, 2 M Glycerol, 1% (m/v) SDS
LB-Medium	1% (m/v) Pepton aus Casein, 0.5% (m/v) Hefe, 1% (m/v) NaCl, autoklaviert
Lysepuffer	20 mM TRIS pH 7.8, 10 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 Tablette cOmplete™ pro 50 ml Puffer
Magnesiumchlorid-Lösung	1 M MgCl ₂
Puffer A	10 mM TRIS pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT
Puffer B	10 mM TRIS pH 7.8, 1 mM EDTA, 1 mM DTT, 1 M NaCl
Puffer E	100 mM TRIS pH 7.8, 1 M NaCl, 1 mM EDTA, 2.5 mM <i>d</i> -Desthiobiotin
Puffer R	100 mM TRIS pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA, 1 mM HABA
Puffer W	100mM TRIS pH 7.8, 150 mM NaCl, 1 mM EDTA
SDS-Lösung	10% (m/v) SDS
4x SDS-Probenpuffer	250 mM TRIS pH 6.8, 8% (m/v) SDS, 40% (v/v) Glycerol, 0.04% (m/v) Bromphenolblau, 8% (m/v) β-Mercaptoethanol
SDS-Sammelgelpuffer	1 M TRIS pH 6.8
SDS-Trenngelpuffer	1 M TRIS pH 8.8
TAE-Puffer	2M TRIS pH 7.8, 50 mM EDTA
TCA 5%-Lösung	5% (m/v) Trichloressigsäure
TCA 10%-Lösung	10% (m/v) Trichloressigsäure
Tween-Lösung	1% (m/v) Tween 20

11.4 Bakterienstämme und Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten Bakterienstämme sind in **Tabelle 11.4.1** beschrieben.

In **Tabelle 11.4.2** sind die verwendeten Plasmide aufgelistet.

Tabelle 11.4.1. Verwendete *E. coli* Bakterienstämme, ihr Genotyp und Hersteller.

<i>E. coli</i> Stamm	Genotyp	Hersteller
XL10-Gold	Tet ^r Δ(<i>mcrA</i>)183 Δ(<i>mcrCB-hsdSMR-mrr</i>)173 <i>endA1 supE44 thi-1 recA1 gyrA96 relA1 lac Hte</i> [F' <i>proAB lac^qΔM15 Tn10</i> (Tet ^r) Amy Cam ^r]	Stratagene
BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL	F ⁻ <i>ompT hsdS(r_B⁻m_B⁻) dcm⁺ Tet^r galλ(DE3) endA Hte</i> [argU proL Cam ^r] [argU ileY leuW Strep/Spec ^r]	Stratagene
TG2	[<i>supE hsdΔ5 thi Δ(lac-proAB) Δ(sre-recA)306::Tn10</i> (Tet ^r) F' (<i>traD36pro AB⁺ lac1^q lacZΔM15</i>)]	Stratagene

11. Material und Methoden

Tabelle 11.4.2. Verwendete Plasmide, ihre Eigenschaft und Hersteller.

Name	Eigenschaft	Hersteller
pPR-IBA2-ZM10	Amp ^r , Cm ^r ; Strep-tag II®; ColE1-origin, T7-promotor based expression; inserted tgt-gene as 1.2 kb NheI/EcoRV fragment.	Neeb (2014) ^[220] Jakobi (2013) ^[221]
ptRNA2	Amp ^r ; <i>E. coli</i> tRNA ^{Tyr} as <i>Bst</i> NI fragment under control of T7-promotor in pTZ18U	Curnow and Garcia (1995) ^[88]

11.5 Molekularbiologische Methoden

11.5.1 Expression und Aufreinigung der *Z. mobilis* TGT

Das verwendete Expressions- und Aufreinigungsprotokoll basiert auf Arbeiten von Dr. Stefan Jakobi^[25, 26]. Die *E. coli* Zellen BL21-CodonPlus(DE3)-RIPL (Cam^r) (**Tabelle 11.4.1**) transformiert mit dem Plasmid-Vektor pPR-IBA2-ZM10 (Amp^r) (**Tabelle 11.4.2**) wurden in einer Vorkultur von 100 mL LB-Medium, das neben 100 mg·L⁻¹ Ampicillin noch 34 mg·L⁻¹ Chloramphenicol enthält, über 17 h bei 37°C und 220 rpm kultiviert. Das genutzte Plasmid enthält neben der Ampicillin-Resistenz und der Sequenz für die *Z. mobilis* TGT noch weiter am N-Terminus eine Thrombin-Schnittstelle und den Strep-tag® II. Die Vorkultur wurde zu 2 x 2 L Hauptkultur (LB-Medium inklusive 100 mg·L⁻¹ Ampicillin und 34 mg·L⁻¹ Chloramphenicol) hinzugefügt, welche bis zu einer OD₆₀₀ = 0.7 weiter in den gleichen Bedingungen wie zuvor inkubiert wurde. Dann wurde die Hauptkultur auf 15°C gekühlt und die Expression durch Zugabe von IPTG (Endkonzentration = 1 mM) induziert. Die Hauptkultur wurde für weitere 16 – 18 h bei 15°C und 220 rpm inkubiert, woraufhin dann durch Zentrifugation (10000 rpm bei 4°C) die Zellpellets geerntet wurden. Diese wurden in 100 mL Lysepuffer resuspendiert. Der Zellaufschluss erfolgt mit dem Hochdruck-Homogenisierer EmulsiFlex-C5™ (AVESTIN). Das lösliche Protein im Überstand wurde im Anschluss von den unlöslichen Zellbestandteilen durch Zentrifugation abgetrennt (20.000 rpm, 45 min, 4°C).

Die Aufreinigung des Proteins erfolgte durch zwei FPLC-Schritte unter Verwendung eines ÄKTA Purifier LC-Systems. Das klare Zelllysate wurde als erstes auf eine mit Puffer A äquilibrierte Q-Sepharosesäule (XK 26/15; GE Healthcare) aufgetragen. Bevor die Gradientenelution (lineare Erhöhung des Anteils Puffer B von 0 - 100% bei 4 mL·min⁻¹ Säulendurchfluss) und Fraktionierung des Eluates gestartet werden konnte, wurde die Säule zunächst mit Puffer A gespült. Fraktionen die das Zielprotein *Z. mobilis* TGT enthielten, wurden mittels SDS-PAGE ermittelt. Anschließend wurden die entsprechenden Fraktionen auf eine Strep-Tactin® Superflow® Säule (XK 16/10; IBA) aufgetragen, die zuvor mit Puffer W äquilibriert wurde. Nach dem Auftragen der Fraktionen und einem erneuten Spülen mit Puffer W wurde das Zielprotein mittels Puffer E eluiert.

11. Material und Methoden

Das Zielprotein wurde mit VIVASPIN®20 Zentrifugalkonzentratoren (Sartorius; MWCO = 30000) auf ca. 2 mg·mL⁻¹ aufkonzentriert. Im Anschluss wurde der Strep-tag® II unter Verwendung des Thrombin Cleavage Capture Kits (Novagen®) und Befolgen der Herstelleranleitung über 16 – 18 h bei 20°C abgetrennt. Der abgetrennte Strep-tag® II und das biotinylierte Thrombin des Kits wurden mit Hilfe von Streptavidin-Agarose-Kügelchen durch Filtration abgetrennt. Anschließend wurde die Lösung der aufgereinigten *Z. mobilis* TGT gegen Hochsalzpuffer dialysiert und über die oben genannten VIVASPIN®20 Zentrifugalkonzentratoren auf 12 mg·mL⁻¹ aufkonzentriert. Aliquots von 70 µL wurden bei -20°C gelagert.

11.5.2 SDS-PAGE

Mit SDS-PAGE (*Sodium Dodecyl Sulfate Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) wurde die Identität und Reinheit der *Z. mobilis* TGT überprüft. Die Gele wurden vor jeder Nutzung frisch hergestellt und bestehen aus zwei Bestandteilen, zum einen aus dem Sammelgel und zum anderen aus dem Trenngel (**Tabelle 11.5.2**).

Tabelle 11.5.2. Zusammensetzung des Sammelgels und Trenngels (Menge reicht für zwei Gele).

Reagenz	Volumen in Sammelgel	Volumen in Trenngel
APS-Lösung	60 µL	60 µL
Rotiphorese® Gel 30 (Acrylamide:N,N-Methylenbisacrylamide 37.5:1)	1 mL	3 mL
SDS-Sammelgelpuffer/ SDS-Trenngelpuffer	1.2 mL	2 mL
SDS-Lösung	60 µL	60 µL
TEMED	6 µL	6 µL
entmineralisiertes Wasser	3.75 mL	0.95 mL

Nach dem Aushärten des Trenngels (ca. 10 min) wurde ca. 1 ml Isopropanol eingefüllt. Im Anschluss wurde das Sammelgel aufgetragen und der Kamm für die Beladung der Proben eingefügt, wobei das Isopropanol vollständig verdrängt wird. Nach dem Aushärten des Sammelgels konnten die Proben und Referenzen aufgetragen werden. Zu den 30 µL Probenlösung wurden 10 µL 4x SDS-Probenpuffer hinzugegeben und für 15 min bei 95°C erhitzt. Nach Zentrifugation der Proben wurden 15 µL für die Beladung des SDS-Gels entnommen. Als Referenz dienten schon zuvor aufgereinigte TGT Chargen und *PageRuler™ Prestaint Protein Ladder* (SM0671/2). Die SDS-PAGE wurde in Laemmli-Puffer bei 130 V durchgeführt. Im Anschluss wurde das Gel über Nacht mit Coomassie-Blue Färbelösung versetzt. Am nächsten Tag wurde das Gel für eine Stunde in Coomassie-Blue Entfärbelösung inkubiert, woraufhin die Proteinbanden sichtbar wurden.

11. Material und Methoden

11.5.3 *In vitro* Transkription und Aufreinigung von tRNA

Die Herstellung von *E. coli* tRNA^{Tyr} wurde mit Hilfe des T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Produktionssystems (Promega) durchgeführt und basiert auf einem von Curnow and Garcia (1995)^[88] eingeführten Verfahren. Die *in vitro* Synthese wurde anhand des ptRNA2 Plasmids (**Tabelle 11.4.2**) durchgeführt, welches im Laufe der Aufreinigung durch RQ1 DNase verdaut wird. Die Aufreinigung der tRNA^{Tyr} beinhaltet eine zweimalige Extraktion mit 2 x 1 mL der Mischung Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol (25:24:1 (v/v/v)) gefolgt von 1 x 1 mL der Mischung Chloroform/Isoamylalkohol (24:1 (v/v)).

Nach der ersten Extraktion wurde das ptRNA2 Plasmid auf eine NAP™-25 Säule gegeben und das Eluat von ca. 1.5 ml über Nacht durch die Speed-Vak Vakuumpumpe DNA mini eingedampft. Die Identifizierung und die Reinheit des Plasmids wurde vor dem Eindampfen mittels Agarose Gelelektrophorese bestimmt. Nach der *in vitro* Transkription der tRNA unter Verwendung des T7 RiboMAX™ Express Large Scale RNA Produktionssystems (Promega) und dem Verdau des Plasmids wurde die zweite Extraktion vorgenommen. Im Anschluss wurde die Lösung der erhaltenen tRNA erneut über eine NAP™-25 Säule laufen gelassen und eingedampft.

Die so gewonnene tRNA wurde in der HEPES-Lösung rückgelöst. Die Monomerisierung fand durch Anwendung eines Temperaturgradienten in sechs Stufen zwischen 20 - 70°C und in einem finalen Schritt, bei der die Lösung für 2 h bei 70°C gehalten wird, statt. In dem finalen Schritt wurde der Lösung noch Magnesiumchlorid-Lösung (final 1 mM MgCl₂) hinzugegeben. Im Anschluss wurde die monomerisierte tRNA ein letztes Mal mit einer NAP™-25 Säule gereinigt und mit der Speed-Vak Vakuumpumpe DNA mini eingedampft. Schlussendlich wurde die tRNA^{Tyr} im Assay-Puffer rückgelöst und auf eine Konzentration von ca. 200 µM unter Verwendung des Nanodrop 2000c Spectrophotometers eingestellt. 1 µM tRNA^{Tyr} entspricht einer Absorption von 0.703 A_{260nm}.

11.5.4 Agarose Gel Elektrophorese

Für die Agarose Gel Elektrophorese wurde ein 1% (m/v) Agarose-Gel benötigt. Dafür wurden 0.5 g Agarose in 49.5 mL TAE-Puffer gelöst und kurz in der Mikrowelle erhitzt. Vor dem Ausgießen des Gels wurde 5 µl SYBR® Safe DNA Gel Färbelösung hinzugegeben. 30 µL der DNA-Probe wurden mit 5 µl 6x Mass Ruler Loading Dye (R0621) gemischt und in die Kammern des Gels pipettiert. Fastruler™ DNA Ladder Middle Range und Fastruler™ DNA Ladder Low Range dienten als Referenz. Das Gel wurde für eine Stunde bei 100 V in TAE-Puffer laufen gelassen. Anschließend wurden die Banden unter UV-Licht detektiert.

11. Material und Methoden

11.5.5 Konzentrationsbestimmung von Protein, DNA und tRNA

Die Konzentrationen von DNA, RNA und Proteinproben wurden mit dem Nanodrop 2000c Spectrophotometer festgestellt. Zuvor wurde stets der verwendete Puffer als Nullabgleich vermessen. Die Konzentration von DNA wurde mit Hilfe folgender **Formel 11.5.5.1** berechnet:

$$\text{DNA Konzentration} = A_{260} \cdot 50 \mu\text{g mL}^{-1} \cdot \text{Verdünnungsfaktor}$$

Formel 11.5.5.1.

Die Konzentration der tRNA^{Tyr} wurde mit Hilfe des Extinktionskoeffizienten von 0.703 $A_{260\text{nm}}$ für 1 μM berechnet. Unter Verwendung der **Formel 11.5.2** und mit Hilfe des durch ProtParams^[222] berechneten Extinktionskoeffizienten (**Tabelle 11.5.5**) kann die Proteinkonzentration der *Z. mobilis* TGT bestimmt werden.

$$C_{\text{Protein}} = \frac{A_{280\text{nm}}}{\epsilon_{\lambda} \cdot d}$$

Formel 11.5.5.2.

Tabelle 11.5.5. Extinktionskoeffizienten die 1 $\text{mg} \cdot \text{mL}^{-1}$ Protein entsprechen.

Protein	Extinktionskoeffizient $A_{280\text{nm}}$
<i>Z. mobilis</i> TGT inklusive Thrombinschnittstelle und Strep-tag®II	0.875
<i>Z. mobilis</i> TGT ohne Thrombinschnittstelle und Strep-tag®II nach finaler Aufreinigung	0.789

11.6 Kinetische und thermodynamische Methoden

11.6.1 Enzymkinetische Untersuchung unter Verwendung des Radioaktivassays

Die Inhibitionskonstanten (K_i) der Liganden gegenüber der *Z. mobilis* TGT wurden nach der Methode beschrieben von Meyer *et al.* (2006)^[113] mit leichten Modifikationen durchgeführt. Die Inhibitionskonstanten werden durch Messung der Abnahme der Anfangsgeschwindigkeit (v_i) des Einbaus von $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin in *E. coli* tRNA^{Tyr} in Gegenwart von fünf verschiedenen Inhibitorkonzentrationen im Vergleich zu einer Referenzmessung ohne Inhibitor bestimmt (v_0). Der Einbau des $[8\text{-}^3\text{H}]$ -Guanin in *E. coli* tRNA^{Tyr} fand im Assay-Puffer bei 37°C statt. Abhängig von der erwarteten Affinität wurde zuvor zwischen 9 – 150 nM *Z. mobilis* TGT im Assay-Puffer gelöst und bis auf die Referenz mit aufsteigender Konzentration des zu untersuchenden Inhibitors versetzt.

11. Material und Methoden

Die finale DMSO Konzentration wurde auf 5% (v/v) eingestellt, um die Löslichkeit der Inhibitoren zu gewährleisten. Nach einer Inkubationszeit der TGT mit dem Inhibitor von 10 min wurden die Substrate [8-³H]-Guanin (10 µM) und die *E. coli* tRNA^{Tyr} (1.5 µM), die zuvor im Assay-Puffer gelöst wurden, hinzugegeben. Dann wurden in einem Intervall zwischen 4 und 60 min, abhängig von der Proteinkonzentration, vier Aliquote (15 µL) entnommen und auf Glasfilterplättchen (GC-F, Whatmann) pipettiert. Die katalytische Aktivität der TGT wurde gestoppt indem die Glasfilterplättchen in Eis gekühlte TCA 10%-Lösung überführt wurden. Nach 10 min Inkubationszeit wurden durch zweimaliges Waschen mit TCA 5%-Lösung für je 10 min und 20 min mit Ethanol 96% nicht in die tRNA eingebautes [8-³H]-Guanin herausgewaschen. Die Glasfilterplättchen, an der die tRNA haften bleibt, wurden bei 60°C für 30 min getrocknet und anschließend mit 4 mL Rotiszint[®]eco plus versetzt. Die Proben wurden mit Hilfe des Szintillationszähler Tri-Carb[®] 2810 TR szintigraphisch quantifiziert. Die gemessenen Aktivitäten der Proben wurden benutzt, um die Anfangsgeschwindigkeit (v_i) der Enzymreaktion in Abhängigkeit der Inhibitorkonzentration zu bestimmen. Hierbei wurde die Methode nach Dixon angewendet (**Formel 11.6.1.1**)^[223].

$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]}$$

Formel 11.6.1.1. Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit in Anwesenheit eines Inhibitors (v_i) nach Dixon.

Die geringe Reproduzierbarkeit der maximalen Anfangsgeschwindigkeit in Abwesenheit von Inhibitoren (v_0) macht eine neue Ermittlung für jede Versuchsreihe notwendig und wird wie folgt berechnet: **Formel 11.6.1.2.**

$$v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]}$$

Formel 11.6.1.2. Berechnung der Anfangsgeschwindigkeit in Abwesenheit eines Inhibitors (v_0) nach Dixon.

Die Inhibitionskonstanten (K_i) wurden durch Kombination der **Formeln 11.6.1.1** und **11.6.1.2** mit dem Programm Grafit 4.09TM (Erithacus Software^[224]) berechnet (**Formel 11.6.1.3**).

$$v_i = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m \cdot \left(1 + \frac{[I]}{K_i}\right) + [S]} \cup v_0 = \frac{v_{max} \cdot [S]}{K_m + [S]} \rightarrow \frac{v_0}{v_i} \cdot \frac{K_m + [S]}{K_m} = \frac{1}{K_i} \cdot [I] + \left(\frac{[S]}{K_m} + 1\right)$$

v_0 Anfangsgeschwindigkeit ohne Inhibitor

v_i Anfangsgeschwindigkeit mit Inhibitor

K_m Michaelis-Menten Konstante der tRNA^{Tyr}

$[S]$ tRNA^{Tyr} Konzentration

$[I]$ Inhibitorkonzentration

K_i Inhibitionskonstante

Formel 11.6.1.3. Berechnung der Inhibitionskonstante (K_i).

11. Material und Methoden

11.6.2 Thermodynamische Untersuchungen mit Hilfe der ITC

ITC (*Isothermal Titration Calorimetry*) Messungen zur Bestimmung der Bindungsaffinitäten (K_d) und der thermodynamischen Profile der untersuchten Liganden gegenüber *Z. mobilis* TGT, wurden unter Verwendung des Microcal ITC200 Microcalorimeters (GE Healthcare) durchgeführt. Für den Inhalt der Messzelle wurde die *Z. mobilis* TGT in ITC-Puffer A – C (**Tabelle 11.3**) und einem Zusatz von 3% (v/v) DMSO zu einer finalen Konzentration zwischen 10 – 30 μM gelöst. Der zu untersuchende Ligand wird in DMSO gelöst und mit ITC-Puffer A – C auf eine finale DMSO Konzentration von 3% (v/v) eingestellt. Für den Inhalt der Spritze wurde die Ligandkonzentration in Abhängigkeit des zu erwartenden enthalpischen Signals (ΔH^0_{obs}) zwischen 100 μM und 300 μM gewählt. Die Referenzzelle wurde mit filtriertem demineralisierten Wasser befüllt.

Alle ITC Messungen wurden bei 25°C, einer Referenzleistung von 5 $\text{kcal}\cdot\text{s}^{-1}$ und einer Rührgeschwindigkeit von 750 rpm durchgeführt. Die initiale Verzögerung wurde auf 180 – 300 s eingestellt und der Abstand zwischen jeder weiteren Injektion auf 150 – 180 s.

Nach einer ersten Injektion von 0.3 – 0.6 μL folgten weitere Injektionen zwischen 1.0 – 2.4 μL bis eine Sättigung feststellbar war. Die Rohdaten wurden als Wärmesignale (ΔH^0_{obs}) pro Zeit gesammelt.

Das $A + B \leftrightarrow AB$ Hetero-Assoziations Modell (1:1 Stöchiometrie) wurde angewandt, wodurch ΔH^0 und K_d direkt bestimmbar sind. Das molare Verhältnis der Reaktion (Stöchiometrie n) ergibt sich aus dem Wendepunkt der Isotherme. Die Bindungsterme ΔG^0 und $-T\Delta S^0$ werden mit Hilfe der Temperatur von 298.15 K und den **Formeln 11.6.2.1** und **11.6.2.2** berechnet.

$$\Delta G^0 = -R \cdot T \ln K_d$$

Formel 11.6.2.1.

$$\Delta G^0 = \Delta H^0 - T\Delta S^0$$

Formel 11.6.2.2.

Um den Effekt überlagerter Protonierungseffekte auf das thermodynamische Profil der Bindung zu berücksichtigen, wurden die Direkttitrationen in drei verschiedenen Puffern (HEPES, Tricin, TRIS) durchgeführt^[118, 225]. Die gemessenen ΔH^0_{obs} -Werte wurden auf der Ordinate und die Ionisierungsenthalpie des entsprechenden Puffers (ΔH^0_{ion}) auf die Abszisse (**Abbildung 3.13** und **Abbildung 6.7**) aufgetragen^[226]. Die positive Steigung der linearen Regressionslinie zeigt an, wie viele Protonen pro Mol gebildeter Komplex aus Protein und Ligand aufgenommen werden. Der Ordinaten-Achsenabschnitt zeigt die hinsichtlich des Protonierungseffekts korrigierte Enthalpie (ΔH^0_{bind}) der Ligandbindung an (**Formel 11.6.2.3**).

$$\Delta H^0_{\text{obs}} = \Delta H^0_{\text{bind}} + n_{H^+} \cdot \Delta H^0_{\text{ion}}$$

Formel 11.6.2.3.

11. Material und Methoden

Zur Analyse der Rohdaten, Peak-Integration, Modellanpassung und Bewertung wurden die Programme NITPIC^[227] und SEDPHAT^[228] genutzt. Der initiale Injektions-Peak wurde aus der Messung entfernt und die Flächen unter den verbleibenden Peaks integriert. Um die Wärmesignale, die durch Verdünnung entstehen, zu berechnen, wurden alle gemessenen Wärmesignale, um die Werte der konstanten finalen Injektionen subtrahiert. Zur Darstellung der integrierten Rohdaten und der ITC Thermogramme wurde das Programm GUSSI benutzt^[229]. Die erhaltenen thermodynamischen Werte für die jeweiligen Puffer sind Mittelwerte aus mindestens drei Messungen.

11.7 Röntgenkristallographische Untersuchungen

11.7.1 *Z. mobilis* TGT Kristallisation

Im Rahmen dieser Arbeit wurde überwiegend die Methode der Kokristallisation zur Komplexbildung von Ligand und Protein genutzt. Ausschließlich bei dem Datensatz TGT-**3.3**_{SOAK}^{C2} (**Kapitel 3**) und den Endothiapepsin-Fragment Strukturen (**Kapitel 9**) wurde die alternative *Soaking*-Methode genutzt.

Bei der Kokristallisation ist der Ligand während des gesamten Kristallisationsprozesses anwesend und das Protein kann sich an den Liganden anpassen. Bei der alternativen *Soaking*-Methode werden geeignete Proteinkristalle nach dem Kristallisationsprozess in einen Tropfen, der den Ligand enthält, überführt. Dort kann der Ligand in den Kristall diffundieren.

TGT Kristalle wurden unter Verwendung der *Hanging-Drop Vapour Diffusion* Methode bei 18°C gezüchtet. Zuvor wurden 1.5 µL einer 12 mg·mL⁻¹ *Z. mobilis* TGT Lösung (in Hochsalzpuffer; **Tabelle 11.3**) in Gegenwart von 1.6 mM des zu untersuchenden Liganden (Stammlösung in 100% DMSO) mit demselben Volumen des Kristallisationspuffers gemischt und auf ein Deckglas überführt (1:1-Tropfen). Die Vertiefungen der Kristallisationsplatten wurden zuvor mit 650 µL des Kristallisationspuffers befüllt. Die Deckgläser mit dem 1:1-Tropfen wurden auf die Vertiefung gegeben und mit Silikon versiegelt. In einem Zeitraum von wenigen Tagen bis zu drei Wochen konnten ausreichend große Kristalle erhalten werden. Bei Inhibitor **3.3** (**Kapitel 3**; bzw. in **Kapitel 2** als **2.6c** geführt) wurde neben der Kokristallisation auch die alternative *Soaking*-Methode genutzt. Zu diesem Zweck wurden *Z. mobilis* TGT Kristalle in Abwesenheit eines Inhibitors nach dem oben beschriebenen Protokoll gezüchtet. Geeignete apo-TGT Kristalle wurden in einem Tropfen, bestehend aus 3.3 mM Inhibitor-Stammlösung und dem Kristallisationspuffer, auf ein Deckglas überführt. Die Tropfen auf dem Deckglas wurden für 24 h oberhalb einer Vertiefung mit 650 µL Kristallisationspuffer übertragen und mit Silikon versiegelt.

Vor der Datenerfassung wurden die Kristalle für einige Sekunden in den Kryopuffer überführt und anschließend in flüssigem Stickstoff schockgefroren.

11.7.2 Datensammlung und Prozessierung

Die im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen Datensätze wurden unter kryogenen Bedingungen (100 K) entweder am Helmholtzzentrum für Materialien und Energie, BESSY II in Berlin (Beamline 14.1, 14.2 und 14.3), am DESY in Hamburg (Beamline P14), am Elettra Synchrotrone Triest (Beamline XRD1) oder am ERSF in Grenoble (Beamline ID23-1) mit unterschiedlichen Wellenlängen aufgenommen (**Tabelle 12.2**). Bevor die Datensammlung an den Synchrotrons stattfand, wurden mehrere geeignete Kristalle *in-house* am Institut für Pharmazeutische Chemie in Marburg getestet (Mar-345). An der *in-house* Quelle wurden die Kristalle einer CuK α -Strahlung ($\lambda = 1.5418 \text{ \AA}$) ausgesetzt. Als Strahlenquelle diente dort eine *Incoatec I μ S microfocus sourceTM*, die mit einer *Incoatec Montel Optik* fokussiert wird. Die erhaltenen Diffraktionsbilder wurden mit einem *mar dtb imaging plate systemTM* aufgenommen.

Die Diffraktionsbilder der deponierten Datensätze wurden mit Hilfe von XDS indiziert, prozessiert und skaliert^[230]. Mit dem Programm XDSCONV wurde die Reflektionsdatei XDS_ASCII.HKL in das MTZ-Format überführt und eine Teilmenge von zufällig ausgewählten 5% aller Reflexe entnommen, um den R_{free} -Wert zu berechnen.

Bis auf die Kristallstrukturen TGT·3.9_{CO}^{P21} (**Kapitel 3**), TGT·7.2_{CO}^{P21} und TGT·7.3_{CO}^{P21} (**Kapitel 7**), bei denen zwei TGT-Monomere pro asymmetrische Einheit vorliegen, die Raumgruppe $P2_1$ und Matthews Koeffizienten^[231, 232] zwischen 2.5 und 2.6 $\text{\AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$ vorweisen, liegen alle anderen TGT-Datensätze in der monoklinen Raumgruppe $C2$ mit einem TGT-Monomer pro asymmetrischer Einheit und Matthews Koeffizienten zwischen 2.3 und 2.5 $\text{\AA}^3 \cdot \text{Da}^{-1}$ vor. Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken sind in **Tabelle 12.2** zusammengefasst.

11.7.3 Strukturbestimmung, Verfeinerung und Analyse

Die Kristallstrukturen wurden durch Molekularen Ersatz (*Molecular Replacement*; MR) mit Hilfe des Programms Phaser MR (implementiert im Programmpaket CCP4) gelöst^[233]. Als Suchmodell diente die apo-TGT Struktur (PDB ID: 1POD^[86]). Für die Datensätze TGT·3.9_{CO}^{P21} (**Kapitel 3**), TGT·7.2_{CO}^{P21} und TGT·7.3_{CO}^{P21} (**Kapitel 7**) wurden aus dem Suchmodell die Aminosäuren zwischen Val45 und Leu68, als auch zwischen Asp280 und Gly291, entfernt, um eine geeignete Lösung zu finden.

Zwischen den Verfeinerungszyklen mit dem Programm Phenix.refine (Version 1.10.1-2155_1492)^[234] wurde Coot^[235] zur Modellanpassung genutzt. Nach dem Molekularen Ersatz wurden zu Beginn fünf Zyklen *Rigid Body Refinement* durchgeführt, gefolgt von fünf Zyklen *Cartesian Simulated Annealing*. Weitere Verfeinerungszyklen umfassten *Coordinate xyz*, *Occupancy*, *Individual B-Factor Refinement* und *Metal Restraints* für das Zinkion.

11. Material und Methoden

Bei den Datensätzen TGT·2.6a_{co}^{C2}, TGT·2.6b_{co}^{C2}, TGT·2.6c_{co}^{C2} (**Kapitel 2**), TGT·4.1_{co}^{C2}, TGT·4.2_{co}^{C2} (**Kapitel 4**), TGT·5.1_{co}^{C2}, TGT·5.2_{co}^{C2}, TGT·5.7_{co}^{C2} (**Kapitel 5**), TGT·6.1_{co}^{C2}, TGT·6.2_{co}^{C2} (**Kapitel 6**), TGT·7.1_{co}^{C2}, TGT·7.3_{co}^{C2} (**Kapitel 7**) und EP·9.177^{P21}, EP·9.181^{P21}, EP·9.189^{P21}, EP·9.205^{P21}, EP·9.206^{P21}, EP·9.207^{P21} (**Kapitel 9**) wurden die *B*-Faktoren komplett anisotrop verfeinert. Bei den Datensätzen TGT·3.3_{SOAK}^{C2}, TGT·3.5_{co}^{C2}, TGT·3.6_{co}^{C2}, TGT·3.7_{co}^{C2} (**Kapitel 3**) wurden nur die *B*-Faktoren der Proteinkette anisotrop verfeinert. Wasser, Lösungsmittelmoleküle und Liganden wurden bei diesen Datensätzen isotrop verfeinert. Bei den Datensätzen TGT·3.8_{co}^{C2}, TGT·3.9_{co}^{P21} (**Kapitel 3**), TGT·5.5_{co}^{C2}, TGT·5.6_{co}^{C2}, TGT·5.8_{co}^{C2} (**Kapitel 5**), TGT·7.2_{co}^{C2}, TGT·7.3_{co}^{P21} (**Kapitel 7**) und TGT·8.1_{co}^{C2} (**Kapitel 8**) wurde TLS (*Translation, Liberation, Screw*) Verfeinerung durchgeführt. Die Auswahl der TLS Gruppen erfolgte unter Verwendung des *TLS Motion Determination Servers* (TLSMD)^[236].

Bei dem Datensatz TGT·7.2_{co}^{P21} (**Kapitel 7**) wurden die *B*-Faktoren nicht wie in allen anderen in dieser Arbeit erhaltenen Kristallstrukturen durch *Individual B-Factors*, sondern durch *Group B-Factors* verfeinert. SMILES Codes der Liganden wurden auf der Seite www.molinspiration.com erstellt. Zur energetischen Minimierung, Koordinaten- und *Restraint-File* Generation wurde der *Grade Web Server* genutzt^[237]. Alternative Konformationen der Seitenketten, fehlende Aminosäuren im Suchmodell, Wassermoleküle und Ligandatome wurden in gut definierter positiver $mF_o - DF_c$ Elektronendichte eingebaut und während der Verfeinerung beibehalten, wenn eine entsprechende $2F_o - F_c$ Elektronendichte auftrat und die Besetzung größer als 20% betrug (alternative Konformationen der Seitenkette oder Inhibitoratome).

Die Option „*Find Waters*“, die in Coot implementiert ist, wurde für den Einbau der ersten Wassermoleküle verwendet. Nur solche Wassermoleküle, die nach der Verfeinerung durch eine $2F_o - F_c$ Elektronendichte von $\sigma \geq 1.0$ RMSD, einem *B*-Faktor nicht signifikant größer als 55 Å² und Abständen zwischen 2.3 Å und 3.5 Å zu umgebenden Atomen aufwiesen, wurden in der Struktur behalten.

In TGT·3.3_{SOAK}^{C2} (**Kapitel 3**) wurde die Besetzung des Furanosylrings des Liganden in einer *Constrained Group* mit der alternativen Gruppe B der Reste Leu68 bis einschließlich His73 (finale Besetzung = 57%) gegenüber der alternativen Gruppe A der genannten Aminosäuren (finale Besetzung = 43%) verfeinert. In TGT·3.8_{co}^{C2} (**Kapitel 3**) wurde die Besetzung der Toluolgruppe des Liganden auf final 63% verfeinert. In TGT·7.3_{co}^{C2} (**Kapitel 7**) wurde die Besetzung der alternativen Gruppe A der C(4)-Seitenkette des Liganden, der alternativen Gruppe A von Asn70, als auch die alternative Gruppe A der Wassermoleküle 171 und 347, in einer *Constrained Group* (finale Besetzung = 58%) gegenüber der alternativen Gruppe B der C(4)-Seitenkette, der alternativen Gruppe B von Asn70 und der alternativen Gruppe B der Wassermoleküle 171 und 428 (finale Besetzung = 42%) verfeinert.

11. Material und Methoden

In einer zweiten *Constrained Group* in dem genannten Datensatz wurden das Zinkion und die alternative Gruppe A von Arg328 (finale Besetzung = 21%) gegenüber der alternativen Gruppe B von Arg328 und den Resten Leu314 – Ser316 (finale Besetzung = 79%) verfeinert.

Zur Identifizierung von Chloridionen in den Kristallstrukturen, wurden anomale Karten mit dem Programm ANODE berechnet^[238]. Anomale Signale für Chloridionen in den jeweiligen Datensätzen sind in **Tabelle 11.7.3** zusammengefasst. H-Brücken, Salzbrücken und van-der-Waals Kontakte wurden mit dem Programm CONTACTSYM bestimmt^[139, 140]. H-Brücken und Salzbrücken mit einer Länge von bis zu 3.7 Å Länge wurden berücksichtigt. Für van-der-Waals Kontakte war der *Cut-Off* 4.2 Å, unter Berücksichtigung des jeweiligen Atomtyps und Verwendung von Standard van-der-Waals Kontakten.

Die Kontaktfläche der zwei TGT-Monomere des Homodimers wurde mit Hilfe des PDBePISA Servers berechnet^[138]. RMSD-Werte wurden unter Verwendung des McLachlan Algorithmus (implementiert in dem Programm ProFit; <http://www.bioinf.org.uk/software/profit>) berechnet^[239]. Alle Abbildungen, die Kristallstrukturen zeigen, wurden mit Hilfe des Programms PyMOL erstellt^[240].

Tabelle 11.7.3. Anomale Signale der identifizierten Chloridionen.

Datensatz	Anomales Signal des Chloridions [σ]
TGT•2.6a _{co} ^{C2}	4.7
TGT•2.6b _{co} ^{C2}	7.4
TGT•3.5 _{co} ^{C2}	5.4
TGT•3.6 _{co} ^{C2}	4.5
TGT•4.1 _{co} ^{C2}	5.0
TGT•5.1 _{co} ^{C2}	4.8
TGT•5.2 _{co} ^{C2}	7.0
TGT•5.6 _{co} ^{C2}	4.9
TGT•5.7 _{co} ^{C2}	4.5
TGT•6.1 _{co} ^{C2}	9.0
TGT•6.2 _{co} ^{C2}	9.0

11.8 Weitere biophysikalische Untersuchungen

11.8.1 Native Massenspektroskopie

Nano-ESI-MS Analysen wurden von unseren Kooperationspartnern Dr. Johann Stojko, Thomas Botzanowski unter der Leitung von Dr. Sarah Cianféroni (Laboratoire de Spectrométrie de Masse Bio-Organique, Straßburg, Frankreich) durchgeführt. Details sind in der Literatur beschrieben^[25-27]. Kurz zusammengefasst wurden die TGT Proben zweimal gegen 1 M Ammoniumacetat Puffer pH 7.5 unter Verwendung von Mikrozentrifugen-Gelfiltrations-Säulen (Zeba 0.5mL, Thermo Scientific) umgepuffert. Die Proteinkonzentration wurde spektrophotometrisch bei 280 nm (Nanodrop 2000 Spectrophotometer, Thermo Scientific) bestimmt. Native MS-Experimente wurden mit einem *Hybrid Q-TOF Mass Spectrometer* (Synapt G2 HDMS, Waters) und einer automatisierten Chip-basierten nanoESI Quelle (Triversa Nanomate, Advion Biosciences) im positiven Ionenbetrieb Modus durchgeführt. Die Protein-Homogenität und Reinheit wurde zuvor unter denaturierenden Bedingungen (TGT-Monomer 2 μ M, 1:1 (v/v) Wasser : Acetonitril Mischung, angesäuert mit 1% (v/v) Ameisensäure) und unter Standardeinstellungen durchgeführt (*Cone Voltage* $V_c = 40$ V und *Backing Pressure* $P_i = 2.1$ mbar). Für die Titrationsexperimente in nativen Bedingungen (1 M Ammoniumacetat Puffer pH 7.5) wurden zu 2.5 μ M TGT-Monomer 25 μ M des jeweiligen Inhibitors hinzugegeben (Ratio 1:10).

Nichtkovalente TGT-Dimere und TGT-Ligand-Komplexe blieben durch Feinabstimmung der Geräteparameter, Ionen-Desolvatation und Transmission in der Gasphase erhalten ($V_c = 80$ V, $P_i = 6$ mbar). Die relative Quantifizierung des TGT-Monomeranteils wurde mit Hilfe des Programms MassLynx 4.1 (Waters) unter Beachtung der Spitzenintensitäten beider Monomere (10^+ bis 14^+) und des Dimers (15^+ bis 20^+) erhalten. Die angegebenen Standardabweichungen der Messungen berücksichtigen mindestens Dreifachmessungen.

11. Material und Methoden

11.8.2 PAMPA Messungen

Die Absorption durch passive Diffusion durch Zellmembrane kann durch das Dreikomponentenmodell PAMPA (*Parallel Artificial Membrane Permeation Assay*) simuliert werden^[164]. Die Messungen wurden von Virginie Micallef (F. Hoffmann-La Roche AG, Schweiz) durchgeführt. Der zu untersuchende Ligand dringt von einer Donorlösung ($v = 320 \mu\text{L}$, *Roche Teflon Plate*) durch einen mit einer Phospholipid-Schicht versehenen Filter ($v = 4 \mu\text{L}$, Millipore MAIPN4550), der die Membran simuliert, zu einer Akzeptorlösung ($v = 280 \mu\text{L}$, Millipore MAIPN4550).

Die Permeationskonstante (PAMPA Score [$\text{Pe}/10^{-6} \text{cm}\cdot\text{s}^{-1}$]) wird UV-Spektroskopisch bestimmt, bei dem die Membran- und Akzeptorkonzentrationen des Liganden über die Zeit gemessen werden. Daraus resultieren die PAMPA Kategorien *low* (l) und *medium2high* (m2h). Zur Auswertung wurde das Evaluationsprogramm *pION PAMPA Evaluation Software* verwendet^[164]. Die Donorlösung besteht zu Beginn aus den zu untersuchenden Liganden, der in einem Puffer von 0.05 M MOPSO und 0.5% (m/v) Glykocholsäure bei pH 6.5 gelöst vorliegt. Die Akzeptorlösung besteht aus demselben Puffer, bei dem allerdings die Zugabe des Liganden fehlt. Der Phospholipid-beschichtete Filter, bzw. die Membran, besteht aus 10% (m/v) Ei-Lecithin in Dodecan und 0.5% (m/v) Cholesterin.

11.8.3 pK_a Messungen

Die pK_a -Werte wurden photometrisch unter Verwendung von D-PAS/GLp K_a bestimmt (Sirius Analytical Instruments Ltd.; Reproduzierbarkeit ± 0.05 Einheiten). Die Messungen wurden von Severin Wendelspiess (F. Hoffmann-La Roche AG, Schweiz) durchgeführt. D-PAS nutzt eine Deuterium-UV-Quelle gekoppelt an einen Diodenarraydetektor, um ein Multiwellenlängen UV-Spektrum abhängig vom pH-Wert zu erhalten. In dem angewandten Verfahren wurde die Probenlösung über einen pH-Bereich titriert, in der der Ligand von vollständig protoniert bis vollständig deprotoniert vorlag. Der pK_a -Wert der Probe wird anhand der Änderung der UV-Absorption als Funktion des pH-Wertes berechnet. Die Probenlösung ändert im Verlauf der Titration aufgrund des pH-Werts ihre UV-Absorption bzw. die Änderung von ionisierter zu nicht ionisierter Substanz ändert die UV-Absorption und umgekehrt. In der zu bestimmenden Probe wurden 0.15 M KCl als Hintergrundelektrolyt hinzugegeben.

Im Anschluss wurde der pH-Wert bestimmt und der Probenlösung 0.5 M HCl hinzugefügt, um den pH-Wert auf den Startwert zu bringen (pH = 2). Danach wurde mit 0.5 M KOH titriert und nach jeder pH-Wert Anpassung ein Multiwellenlängen-UV-Spektrum aufgenommen. Die Titration fand unter Argon-Atmosphäre statt, um Absorption und Einfluss auf den pH-Wert von atmosphärischen CO_2 zu verhindern. Der erhaltene Datensatz wurde mit der Software D-PAS berechnet.

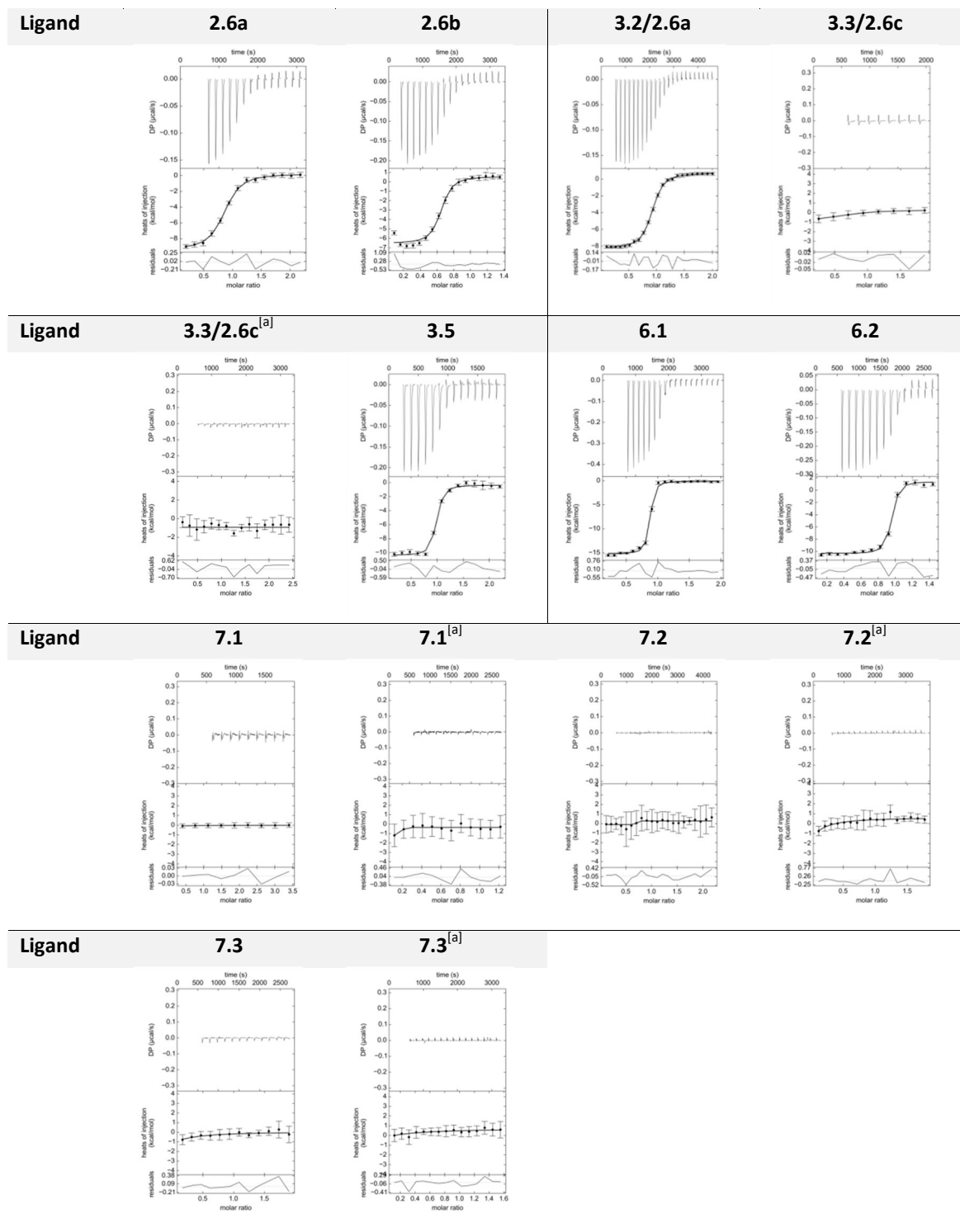
11.9 Synthese der untersuchten TGT-Inhibitoren

Die Synthese der Liganden wurde von unserem Kooperationspartner der Arbeitsgruppe Diederich (ETH Zürich, Schweiz) durchgeführt. Ausführliche Synthesewege der Verbindungen aus **Kapitel 2** wurden in Barandun *et al.* (2015)^[1] publiziert. Die Synthesewege der untersuchten Liganden aus **Kapitel 3** wurden in verschiedenen Publikationen zuvor veröffentlicht^[1, 12, 27, 113]. Die Synthese der neu untersuchten Liganden aus **Kapitel 4** und **5** sind in der Doktorarbeit von Dr. Christoph Hohn beschrieben^[241]. Von der Synthese der Liganden aus **Kapitel 6** folgt eine Arbeit von Elisabeth Schäfer. Die Synthese der Verbindungen aus **Kapitel 7** wird in einer Folgepublikation veröffentlicht. Die Synthese der Verbindung **8.1** des **Kapitels 8** ist in der Publikation Hohn *et al.* (2016)^[2] zu finden.

12. Appendix

12.1 Thermogramme und Regressionskurven (ITC)

Tabelle 12.1. Repräsentative Thermogramme und resultierende Regressionskurven der ITC.



Graphen der Direkttitrationen im HEPES Puffer. ^[a] Verdrängungstitrationen mit **3.1 (Kapitel 3)** als starker Ligand und vollständiger Sättigung des Enzyms mit dem untersuchten Liganden. Graphen wurden mit Hilfe von GUSSI erzeugt^[229].

12. Appendix

12.2 Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken

Tabelle 12.2. Datensammlungs-, Prozessierungs- und Verfeinerungsstatistiken der deponierten Datensätze.

Complex ^a · Chapter ^a · Ligand ^a <small>space group</small>	TGT-2.6a _{CO} ^{C2}	TGT-2.6b _{CO} ^{C2}	TGT-2.6c _{CO} ^{C2}	TGT-3.3 _{SOAK} ^{C2}	TGT-3.5 _{CO} ^{C2}	TGT-3.6 _{CO} ^{C2}	TGT-3.7 _{CO} ^{C2}
PDB ID	4LEQ	4LBU	4KWO	5I09	5I00	5I02	5I06
(A) Data Collection and Processing							
Collection site	BESSY 14.1	BESSY 14.2	BESSY 14.2	BESSY 14.3	BESSY 14.3	ELETTRA XRD1	BESSY 14.1
No. crystal used	1	1	1	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.85507	0.91841	0.895	0.895	1.0000	0.91841
Unit cell parameters							
a [Å]	90.6	90.3	85.2	91.0	91.3	84.5	84.9
b [Å]	65.1	65.2	65.1	65.1	65.1	64.8	64.9
c [Å]	70.4	70.6	71.4	70.8	70.6	71.4	71.2
β [°]	96.3	96.3	94.0	96.3	96.3	94.1	93.9
(B) Diffraction data^[a]							
Resolution range [Å]	50.00 - 1.41 (1.43 - 1.41)	50.00 - 1.17 (1.19 - 1.17)	50.00 - 1.32 (1.33 - 1.32)	45.22 - 1.44 (1.53 - 1.44)	45.38 - 1.49 (1.58 - 1.49)	42.53 - 1.25 (1.33 - 1.25)	42.53 - 1.36 (1.44 - 1.36)
Unique reflections	76331 (3734)	136269 (6654)	90020 (4448)	74015 (11865)	67096 (10734)	105188 (1676)	81972 (13067)
<i>R</i> (<i>I</i>) _{sym} [%] ^[b]	6.5 (49.7)	4.3 (48.0)	4.1 (43.1)	5.1 (49.5)	6.1 (48.0)	5.5 (49.1)	3.7 (48.4)
Completeness [%]	96.9 (94.7)	99.4 (97.6)	98.3 (96.9)	99.5 (99.1)	99.6 (99.0)	99.1 (97.9)	99.1 (97.9)
Redundancy	3.8 (3.7)	3.1 (2.9)	4.2 (4.0)	3.4 (3.3)	3.4 (3.3)	3.3 (3.3)	3.8 (3.8)
<i>I</i> /σ [<i>I</i>]	16.6 (2.8)	23.5 (2.1)	28.0 (3.0)	14.9 (2.9)	15.2 (3.1)	11.3 (2.1)	17.7 (2.6)
Matthews coefficient [Å ³ · Da ⁻¹] ^[c]	2.4	2.4	2.3	2.4	2.4	2.3	2.3
Solvent content [%]	48.7	48.8	46.4	49.2	49.3	45.7	45.9
Molecules in asymmetric unit	1	1	1	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix^[234]							
Resolution range [Å]	40.88 - 1.41	14.91 - 1.17	26.96 - 1.32	45.22 - 1.44	43.38 - 1.49	42.15 - 1.25	42.33 - 1.36
Reflections used in refinement	72493	129428	85496	73978	67060	105178	81969
Final <i>R</i> values							
<i>R</i> _{free} [%] ^[d]	14.9	15.2	16.3	16.6	15.6	15.8	17.3
<i>R</i> _{work} [%] ^[e]	12.3	13.6	14.6	13.3	12.5	13.7	14.3
No. of atoms (non-hydrogen)							
Protein atoms	2984	2941	2847	3024	3009	2866	2835
Water molecules	428	435	291	396	408	324	275
Ligand atoms	28	29	29	26	26	27	25
RMSD from ideality							
Bond angles [°]	1.1	1.1	1.1	0.8	0.8	0.8	0.8
Bond length [Å]	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.005
Ramachandran plot^[f]							
Most favoured regions [%]	94.7	93.4	95.3	95.5	94.0	93.7	94.6
Additionally allowed regions [%]	5.0	6.3	4.4	4.2	5.7	5.9	5.0
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mean <i>B</i>-factor [Å²]^[g]							
Protein atoms	14.1	14.1	17.1	18.0	16.6	17.8	19.6
Water molecules	30.5	30.1	30.9	35.3	33.7	35.4	35.8
Ligand atoms	11.8	13.4	15.3	17.4	11.9	12.8	16.8

12. Appendix

Complex·Chapter.Ligand ^{space group} PDB ID	TGT·3.8 _{CO} ^{C2} 5I03	TGT·3.9 _{CO} ^{P21} 5I07	TGT·4.1 _{CO} ^{C2} 5JGM	TGT·4.2 _{CO} ^{C2} 5JGO	TGT·5.1 _{CO} ^{C2} 5J9M	TGT·5.2 _{CO} ^{C2} 5JT5	TGT·5.5 _{CO} ^{C2} 5J9N
(A) Data Collection and Processing							
Collection site	BESSY 14.1	DESY P14	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.3	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystal used	1	1	1	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.9763	0.91841	0.91841	0.8944	0.91841	0.91841
Unit cell parameters							
a [Å]	85.1	69.1	91.2	90.9	91.0	90.3	90.4
b [Å]	64.6	78.9	65.4	65.1	64.9	65.3	64.5
c [Å]	71.0	85.2	71.1	70.8	70.7	70.6	71.3
β [°]	93.6	109.0	96.6	96.1	96.3	96.1	92.8
(B) Diffraction data^[a]							
Resolution range [Å]	42.49 - 1.73 (1.83 - 1.73)	19.87 - 1.89 (2.01 - 1.89)	45.29 - 1.38 (1.46 - 1.38)	43.59 - 1.37 (1.45 - 1.37)	45.21 - 1.33 (1.41 - 1.33)	43.53 - 1.21 (1.28 - 1.21)	45.12 - 1.64 (1.74 - 1.64)
Unique reflections	38683 (6142)	67732 (10527)	84560 (13406)	84027 (12549)	93288 (14902)	122593 (19268)	49307 (7770)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%] ^[b]	5.6 (49.3)	8.2 (49.3)	4.1 (49.5)	6.1 (49.8)	4.5 (48.9)	4.1 (38.4)	6.3 (34.2)
Completeness [%]	95.7 (94.9)	98.3 (95.8)	98.9 (97.4)	97.5 (90.6)	99.2 (98.4)	98.7 (96.4)	97.5 (95.2)
Redundancy	2.9 (2.8)	4.3 (4.2)	3.4 (3.4)	2.9 (2.9)	2.9 (2.9)	3.7 (3.8)	3.0 (2.9)
I/σ [I]	14.5 (2.2)	11.3 (2.7)	17.0 (2.2)	11.2 (2.1)	14.3 (2.3)	15.7 (3.3)	9.28 (2.0)
Matthews coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[c]	2.3	2.6	2.5	2.4	2.4	2.4	2.4
Solvent content [%]	45.8	51.8	49.8	49.2	49.0	48.9	49.1
Molecules in asymmetric unit	1	2	1	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix^[234]							
Resolution range [Å]	43.49 - 1.73	19.87 - 1.89	43.85 - 1.38	43.62 - 1.37	45.21 - 1.33	39.80 - 1.21	41.68 - 1.64
Reflections used in refinement	38682	67714	84557	84018	93249	122586	49285
Final R values							
R_{free} [%] ^[d]	20.2	22.0	16.2	16.2	15.7	15.7	23.7
R_{work} [%] ^[e]	18.1	19.1	13.4	13.5	12.9	13.5	21.3
No. of atoms (non-hydrogen)							
Protein atoms	2793	A: 2864 B: 2852	2986	2989	3002	2988	2823
Water molecules	223	434	441	368	400	430	208
Ligand atoms	24	46 (2 x 23)	22	23	14	15	15
RMSD from ideality							
Bond angles [°]	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8	0.8	0.8
Bond length [Å]	0.006	0.008	0.005	0.005	0.005	0.005	0.006
Ramachandran plot^[f]							
Most favoured regions [%]	93.7	93.7	94.7	95.0	94.9	94.9	95.5
Additionally allowed regions [%]	5.9	6.0	5.0	4.4	4.8	4.8	4.2
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.6	0.3	0.3	0.3
Mean B-factor [Å²]^[g]							
Protein atoms	23.6	A: 25.6 B: 27.3	17.8	16.8	17.2	17.1	30.5
Water molecules	34.9	34.6	33.7	32.9	34.7	33.6	37.6
Ligand atoms	17.6	A: 17.0 B: 20.2	15.8	16.5	25.3	28.8	42.7

12. Appendix

Complex·Chapter.Ligand ^{space group} protocol	TGT·5.6 _{CO} ^{C2}	TGT·5.7 _{CO} ^{C2}	TGT·5.8 _{CO} ^{C2}	TGT·6.1 _{CO} ^{C2}	TGT·6.2 _{CO} ^{C2}	TGT·7.1 _{CO} ^{C2}	TGT·7.2 _{CO} ^{C2}
PDB ID	5JT6	5J9O	5JT7	5JSV	5JSW	5LPO	5LPP
(A) Data Collection and Processing							
Collection site	BESSY 14.1	BESSY 14.1	BESSY 14.1	DESY P14	DESY P14	BESSY 14.1	ELETTRA XRD1
No. crystal used	1	1	1	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.91841	0.918409	0.91841	0.9763	0.9763	0.91841	1.0000
Unit cell parameters							
a [Å]	90.3	90.1	90.3	90.5	90.3	84.7	85.4
b [Å]	64.2	63.8	64.2	65.2	65.0	64.8	64.4
c [Å]	71.0	71.0	71.2	70.6	70.8	71.2	71.2
β [°]	92.8	92.9	93.2	96.4	96.4	93.5	93.9
(B) Diffraction data^[a]							
Resolution range [Å]	45.11 - 1.54 (1.63 - 1.54)	19.45 - 1.41 (1.49 - 1.41)	42.80 - 1.70 (1.80 - 1.70)	43.58 - 1.17 (1.24 - 1.17)	44.89 - 1.22 (1.29 - 1.22)	42.44 - 1.42 (1.50 - 1.42)	42.61 - 1.99 (2.11 - 1.99)
Unique reflections	59224 (9422)	76131 (11952)	44054 (7099)	134123 (20280)	114740 (17773)	71176 (10554)	26417 (4213)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%] ^[b]	2.8 (49.3)	3.5 (49.3)	3.1 (40.6)	3.7 (27.3)	4.1 (41.8)	3.6 (32.2)	5.4 (48.8)
Completeness [%]	98.4 (97.3)	97.9 (95.6)	98.1 (98.4)	97.4 (91.2)	95.2 (91.5)	97.8 (90.1)	99.4 (99.3)
Redundancy	2.9 (2.9)	3.8 (3.8)	2.5 (2.5)	4.0 (3.3)	4.2 (4.1)	3.0 (2.7)	3.7 (3.6)
I/σ [I]	18.8 (2.1)	16.9 (2.3)	15.8 (2.0)	19.0 (4.3)	17.1 (3.0)	17.2 (2.9)	15.8 (2.8)
Matthews coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[c]	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.3	2.3
Solvent content [%]	48.6	48.1	48.7	48.1	48.7	45.8	45.9
Molecules in asymmetric unit	1	1	1	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix^[234]							
Resolution range [Å]	41.11 - 1.54	19.45 - 1.41	42.80 - 1.70	39.97 - 1.17	30.16 - 1.22	42.44 - 1.42	42.61 - 1.99
Reflections used in refinement	59215	76103	44050	134119	114725	71169	26415
Final R values							
R_{free} [%] ^[d]	18.1	16.9	20.5	13.9	14.4	16.3	21.6
R_{work} [%] ^[e]	16.3	14.0	17.2	12.1	12.5	13.2	18.1
No. of atoms (non-hydrogen)							
Protein atoms	2889	2978	2853	3073	3081	2946	2600
Water molecules	207	294	209	474	405	284	154
Ligand atoms	15	15	15	29	33	30	27
RMSD from ideality							
Bond angles [°]	0.8	0.8	0.8	0.9	0.8	0.8	0.8
Bond length [Å]	0.006	0.006	0.006	0.005	0.005	0.005	0.007
Ramachandran plot^[f]							
Most favoured regions [%]	95.9	94.3	95.8	94.0	94.7	94.8	96.5
Additionally allowed regions [%]	3.8	5.4	3.9	5.7	5.0	4.9	3.2
Generously allowed regions [%]	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3	0.3
Mean B-factor [Å²]^[g]							
Protein atoms	31.6	26.8	35.9	14.7	15.5	18.0	34.1
Water molecules	37.3	40.3	40.6	33.4	34.2	35.1	39.4
Ligand atoms	41.2	30.9	41.6	15.7	21.0	13.9	40.7

12. Appendix

Complex·Chapter.Ligand ^{space group} PDB ID	TGT·7.2 _{CO} ^{P21} 5LPQ	TGT·7.3 _{CO} ^{C2} 5LPS	TGT·7.3 _{CO} ^{P21} 5LPT	TGT·8.1 _{CO} ^{C2} 5EGR
(A) Data Collection and Processing				
Collection site	DESY P14	ESRF ID23-1	BESSY 14.1	BESSY 14.1
No. crystal used	1	1	1	1
Wavelength λ [Å]	0.7999	0.97917	0.91841	0.91841
Unit cell parameters				
a [Å]	68.9	85.0	68.7	90.5
b [Å]	78.9	64.6	78.9	64.5
c [Å]	84.9	71.0	84.9	71.0
β [°]	109.7	93.6	108.7	93.2
(B) Diffraction data^[a]				
Resolution range [Å]	50.09 - 2.52 (2.68 - 2.52)	42.39 - 1.27 (1.35 - 1.27)	48.29 - 2.36 (2.50 - 2.36)	42.85 - 1.55 (1.64 - 1.55)
Unique reflections	28457 (4196)	97768 (15185)	35384 (5544)	58639 (9399)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%] ^[b]	11.4 (47.9)	3.6 (47.7)	11.8 (49.5)	3.2 (44.2)
Completeness [%]	97.9 (90.1)	96.7 (93.4)	99.0 (96.6)	99.0 (98.7)
Redundancy	3.8 (3.8)	3.8 (3.8)	3.4 (3.3)	2.9 (2.8)
I/σ [I]	9.9 (2.9)	17.2 (2.8)	8.1 (2.6)	15.5 (2.1)
Matthews coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[c]	2.5	2.3	2.5	2.4
Solvent content [%]	51.3	45.6	51.5	48.8
Molecules in asymmetric unit	2	1	2	1
(C) Refinement with Phenix^[234]				
Resolution range [Å]	43.67 - 2.52	42.37 - 1.27	40.51 - 2.36	42.85 - 1.55
Reflections used in refinement	28448	97758	35371	58635
Final R values				
R_{free} [%] ^[d]	26.2	16.8	23.3	19.1
R_{work} [%] ^[e]	22.7	15.0	20.1	17.2
No. of atoms (non-hydrogen)				
Protein atoms	5441	2759	5486	2844
Water molecules	105	256	197	218
Ligand atoms	62 (2 x31)	32	66 (2 x33)	19
RMSD from ideality				
Bond angles [°]	0.5	0.8	0.7	1.0
Bond length [Å]	0.004	0.005	0.006	0.007
Ramachandran plot^[f]				
Most favoured regions [%]	93.0	95.0	93.6	95.1
Additionally allowed regions [%]	6.7	4.6	6.1	4.6
Generously allowed regions [%]	0.3	0.4	0.3	0.3
Mean B-factor [Å²]^[g]				
Protein atoms	A: 32.86 B: 36.04	20.79	A: 30.49 B: 32.30	34.9
Water molecules	31.71	35.94	32.68	41.1
Ligand atoms	A: 28.81 B: 31.69	19.36	A: 24.33 B: 24.17	40.0

12. Appendix

Complex·Chapter.Ligand ^{space group} protocol	EP-9.177 ^{P21}	EP-9.181 ^{P21}	EP-9.189 ^{P21}	EP-9.205 ^{P21}	EP-9.206 ^{P21}	EP-9.207 ^{P21}
PDB ID	5LWR	4Y3A	4Y3H	4Y3L	4Y5A	4Y3T
(A) Data Collection and Processing						
Collection site	BESSY	BESSY	BESSY	BESSY	BESSY	BESSY
	14.1	14.1	14.1	14.3	14.3	14.2
No. crystal used	1	1	1	1	1	1
Wavelength [Å]	0.91841	0.91841	0.91841	0.8944	0.8944	0.91841
Unit cell parameters						
a [Å]	45.2	45.2	45.3	45.2	45.4	45.3
b [Å]	72.8	73.0	72.9	72.9	72.9	72.9
c [Å]	52.6	52.6	52.6	52.6	52.8	52.6
β [°]	109.2	109.1	109.3	109.5	109.6	109.4
(B) Diffraction data^[a]						
Resolution range [Å]	42.68 - 1.25 (1.32 - 1.25)	42.68 - 1.17 (1.24 - 1.17)	42.72 - 1.23 (1.30 - 1.23)	42.62 - 1.16 (1.23 - 1.16)	50.00 - 1.48 (1.50 - 1.48)	42.76 - 1.42 (1.50 - 1.42)
Unique reflections	87290 (12864)	102974 (12665)	90396 (12876)	108943 (15845)	57009 (2868)	60833 (9430)
$R(I)_{\text{sym}}$ [%] ^[b]	3.8 (31.8)	3.2 (18.8)	4.0 (24.2)	6.1 (41.9)	7.8 (47.6)	6.9 (48.5)
Completeness [%]	98.1 (89.7)	94.9 (72.4)	96.3 (85.0)	98.0 (88.5)	99.2 (99.9)	99.1 (95.3)
Redundancy	4.0 (3.0)	3.5 (2.4)	3.7 (3.3)	4.0 (3.0)	3.5 (3.4)	4.0 (3.9)
I/σ [I]	20.7 (3.5)	19.9 (4.3)	17.5 (4.3)	17.7 (3.2)	16.5 (2.6)	15.7 (3.4)
Matthews coefficient [Å ³ ·Da ⁻¹] ^[c]	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4	2.4
Solvent content [%]	47.8	48.0	47.9	47.8	48.2	47.9
Molecules in asymmetric unit	1	1	1	1	1	1
(C) Refinement with Phenix^[234]						
Resolution range [Å]	28.12 - 1.25	42.68 - 1.17	42.72 - 1.38	42.62 - 1.37	26.84 - 1.35	42.76 - 1.37
Reflections used in refinement	87266	102973	90392	108935	56984	60831
Final R values						
R_{free} [%] ^[d]	13.1	11.1	10.8	11.6	11.9	11.7
R_{work} [%] ^[e]	11.3	12.9	12.8	13.2	15.7	15.0
No. of atoms (non-hydrogen)						
Protein atoms	2892	2883	2846	2813	2801	2810
Water molecules	337	312	315	298	286	289
Fragment atoms	38	19	9	16	11	36
RMSE from ideality						
Bond angles [°]	0.9	1.3	1.2	1.2	1.2	1.2
Bond length [Å]	0.006	0.006	0.007	0.006	0.007	0.007
Ramachandran plot^[f]						
Most favoured regions [%]	93.9	93.9	93.5	93.9	93.5	94.2
Additionally allowed regions [%]	6.1	6.1	6.5	6.1	6.5	5.8
Generously allowed regions [%]	0	0	0	0	0	0
Mean B-factor [Å²]^[g]						
Protein atoms	11.8	11.2	11.6	9.3	10.1	10.1
Water molecules	29.1	28.5	28.2	24.5	25.1	26.0
Fragment atoms	11.7	16.3	22.6	17.8	15.5	20.8

^[a]Values in parentheses are statistics for the highest resolution shell. ^[b] $R(I)_{\text{sym}} = [\sum_h \sum_i |I_i(h) - \langle I(h) \rangle| / \sum_h \sum_i I_i(h)] \cdot 100$, where $\langle I(h) \rangle$ is the mean of the $I(h)$ observation of reflection h . ^[c]Calculated with MATTPROB^[231, 232]. ^[d] R_{free} was calculated as shown for R_{work} but on refinement-excluded 5% of data. ^[e] $R_{\text{work}} = \sum_{hkl} |F_o - F_c| / \sum_{hkl} |F_o|$. ^[f]Determined with PROCHECK^[242]. ^[g]Calculated with MOLEMAN^[243].

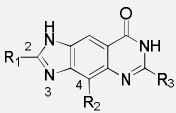





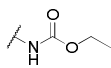


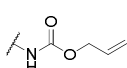


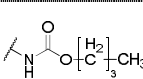


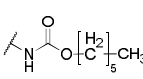


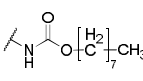


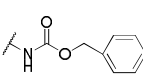












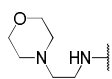


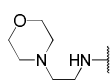


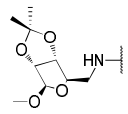


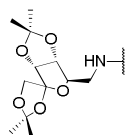


12. Appendix

12.3 Untersuchte TGT-Inhibitoren

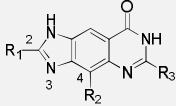

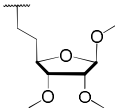


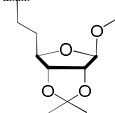


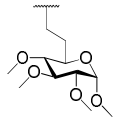

Tabelle 12.3.1. Inhibitoren basierend auf dem *lin*-Benzoguanin-Grundgerüst.

Ligand-name				$K_i^{[a]}$ [nM]	$K_d^{[b]}$ [nM]	Komplexname	PDB ID
	R_1	R_2	R_3				
2.1 ^[c] 3.1 4.10 5.11 6.3				58 ± 36 _[12]	52 ± 7 _[118]	TGT•2.1 _{SOAK} ^{C2} TGT•3.1 _{SOAK} ^{C2} TGT•4.10 _{SOAK} ^{C2} TGT•5.11 _{SOAK} ^{C2} TGT•6.3 _{SOAK} ^{C2}	4PUK ^[118]
2.2				235 ± 50 _[14]	---	---	---
2.3				97 ± 5 ^[14]	---	TGT•2.3 _{SOAK} ^{C2}	3E0U ^[13]
2.4				55 ± 3 ^[14]	---	TGT•2.4 _{SOAK} ^{C2}	3GC5 ^[13]
2.5 ^[c] 3.6				4 ± 2 ^[14]	n.b.	TGT•2.5 _{SOAK} ^{C2} TGT•3.6 _{CO} ^{C2}	3EOS ^[13] 5I02
2.6a ^[c] 3.2				217 ± 81 _[1]	288 ± 55 _[1] [d]	TGT•2.6a _{CO} ^{C2} TGT•3.2 _{CO} ^{C2}	4LEQ ^[1]
2.6b				286 ± 16 _[1]	276 ± 69 _[1]	TGT•2.6b _{CO} ^{C2}	4LBU ^[1]
2.6c ^[c] 3.3				353 ± 106 _[1]	n.b.	TGT•2.6c _{CO} ^{C2} TGT•3.3 _{CO} ^{C2} TGT•3.3 _{SOAK} ^{C2}	4KWO ^[1] 5I09
3.4				193 ± 41	n.b.	TGT•3.4 _{CO} ^{C2} TGT•3.4 _{SOAK} ^{C2}	4FR6 ^[27] 4FSA ^[27]
3.5 ^[c] 4.12				2 ± 1 ^[14]	32 ± 9	TGT•3.5 _{CO} ^{C2} TGT•4.12 _{CO} ^{C2} TGT•3.5 _{SOAK} ^{C2}	5I00 3GE7 ^[13]
3.7				3700 ± 900 _[137]	n.b.	TGT•3.7 _{CO} ^{C2} TGT•3.7 _{SOAK} ^{C2}	5I06 1Y5X ^[137]
3.8				6900 ± 1700 _[137]	n.b.	TGT•3.8 _{CO} ^{C2} TGT•3.8 _{SOAK} ^{C2}	5I03 1Y5W ^[137]

12. Appendix

Ligand-name		$K_i^{[a]}$ [nM]	$K_d^{[b]}$ [nM]	Komplexname	PDB ID
	R_1	R_2	R_3		
3.9				$1000 \pm 300^{[137]}$ n.b.	TGT•3.9 _{CO} ^{P21} TGT•3.9 _{SOAK} ^{C2} 5I07 1Y5V ^[137]
4.1				808 ± 98 n.b.	TGT•4.1 _{CO} ^{C2} 5JGM
4.2				791 ± 92 n.b.	TGT•4.2 _{CO} ^{C2} 5JGO
4.3				n.b. n.b.	--- --
4.4				n.b. n.b.	--- --
4.5				n.b. n.b.	--- --
4.6				n.b. n.b.	--- --
4.7				$35 \pm 9^{[12]}$ ---	TGT•4.7 _{CO} ^{C2} 4Q4S ^[119]
4.8				$28050 \pm 11970^{[114]}$ ---	TGT•4.8 _{CO} ^{C2} 3RR4 ^[114]
4.9				$40830 \pm 4270^{[114]}$ ---	TGT•4.9 _{CO} ^{C2} 3TLL ^[114]
4.11 ^[c] 5.9				$6500 \pm 2900^{[114]}$ $411 \pm 64^{[118]}$	TGT•4.11 _{CO} ^{C2} TGT•5.9 _{CO} ^{C2} 3S1G ^[114]
5.10				$4100^{[114]}$ ---	TGT•5.10 _{CO} ^{C2} 4Q4R ^[119]
5.12				$6 \pm 6^{[12]}$ $35 \pm 7^{[118]}$	TGT•5.12 _{SOAK} ^{C2} 4PUJ ^[118]
6.1				n.b. 14 ± 7	TGT•6.1 _{CO} ^{C2} 5JSV
6.2				n.b. 32 ± 13	TGT•6.2 _{CO} ^{C2} 5JSW

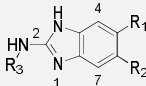
















12. Appendix

Ligand-name		$K_i^{[a]}$ [nM]	$K_d^{[b]}$ [nM]	Komplexname	PDB ID		
	R ₁	R ₂	R ₃				
7.1				243 ± 14	n.b.	TGT·7.1 _{CO} ^{C2}	5LPO
7.2				544 ± 174	n.b.	TGT·7.2 _{CO} ^{C2} TGT·7.2 _{CO} ^{P21}	5LPP 5LPQ
7.3				237 ± 41	n.b.	TGT·7.3 _{CO} ^{C2} TGT·7.3 _{CO} ^{P21}	5LPS 5LPT

^[a]Bestimmt durch den Radioaktivassay. ^[b]Bestimmt durch ITC. ^[c]Inhibitor wurde in den Kapiteln unterschiedlich benannt.

^[d]Wurde für **Kapitel 3** erneut bestimmt: 275 ± 49 nM. n.b = nicht bestimmt.

Tabelle 12.3.2. Inhibitoren basierend auf dem Benzimidazol-Grundgerüst.

Ligand-name				K_i [μ M] ^[a]	Komplexname	PDB ID
	R ₁	R ₂	R ₃			
5.1				300 ± 37	TGT•5.1 _{CO} ^{C2}	5J9M
5.2				544 ± 43	TGT•5.1 _{CO} ^{C2}	5JT5
5.3				270 ± 50	---	---
5.4				264 ± 40	---	---
5.5				283 ± 40	TGT•5.5 _{CO} ^{C2}	5j9N
5.6				282 ± 18	TGT•5.6 _{CO} ^{C2}	5JT6
5.7				19 ± 2	TGT•5.7 _{CO} ^{C2}	5J9O
5.8				58 ± 2	TGT•5.8 _{CO} ^{C2}	5JT7

^[a]Bestimmt durch den Radioaktivassay.

Tabelle 12.3.3. Inhibitor basierend auf dem Immucillin-Grundgerüst.

Ligand-name	Struktur	K_i [μM] ^[a]	Komplexname	PDB ID
8.1		2.7 ± 1.6 ^[2]	TGT·8.1 _{CO} ^{C2}	5EGR ^[2]

^[a]Bestimmt durch den Radioaktivassay.

13. Referenzen

- [1] Barandun, L. J., Ehrmann, F. R., Zimmerli, D., Immekus, F., Giroud, M., Grünenfelder, C., Schweizer, W. B., Bernet, B., Betz, M., Heine, A., Klebe, G. & Diederich, F. (2015) Replacement of Water Molecules in a Phosphate Binding Site by Furanoside-appended *lin*-Benzoguanine Ligands of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT). *Chem. Eur. J.* **21**, 126-135.
- [2] Hohn, C., Härtsch, A., Ehrmann, F. R., Pfaffeneder, T., Trapp, N., Dumele, O., Klebe, G. & Diederich, F. (2016) An Immucillin-Based Transition-State-Analogous Inhibitor of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT). *Chem. Eur. J.* **22**, 6750-6754.
- [3] Neeb, M., Hohn, C., Ehrmann, F. R., Härtsch, A., Heine, A., Diederich, F. & Klebe, G. (2016) Occupying a Flat Subpocket in a tRNA-Modifying Enzyme with Ordered or Disordered Side Chains: Favorable or Unfavorable for Binding? *Bioorg. Med. Chem.* **24**, 4900-4910.
- [4] Schiebel, J., Radeva, N., Krimmer, S. G., Wang, X., Stieler, M., Ehrmann, F. R., Fu, K., Metz, A., Huschmann, F. U., Weiss, M. S., Mueller, U., Heine, A. & Klebe, G. (2016) Six Biophysical Screening Methods Miss a Large Proportion of Crystallographically Discovered Fragment Hits: A Case Study. *ACS Chem. Biol.* **11**, 1693-1701.
- [5] Radeva, N., Schiebel, J., Wang, X., Krimmer, S. G., Fu, K., Stieler, M., Ehrmann, F. R., Metz, A., Rickmeyer, T., Betz, M., Winquist, J., Park, A. Y., Huschmann, F. U., Weiss, M. S., Mueller, U., Heine, A. & Klebe, G. (2016) Active Site Mapping of an Aspartic Protease by Multiple Fragment Crystal Structures: Versatile Warheads to Address a Catalytic Dyad. *J. Med. Chem.* **59**, 9743-9759.
- [6] Radeva, N., Krimmer, S. G., Stieler, M., Fu, K., Wang, X., Ehrmann, F. R., Metz, A., Huschmann, F. U., Weiss, M. S., Mueller, U., Schiebel, J., Heine, A. & Klebe, G. (2016) Experimental Active-Site Mapping by Fragments: Hot Spots Remote from the Catalytic Center of Endothiapepsin. *J. Med. Chem.* **59**, 7561-7575.
- [7] Schiebel, J., Krimmer, Stefan G., Röwer, K., Knörlein, A., Wang, X., Park, Ah Y., Stieler, M., Ehrmann, Frederik R., Fu, K., Radeva, N., Krug, M., Huschmann, Franziska U., Glöckner, S., Weiss, Manfred S., Mueller, U., Klebe, G. & Heine, A. (2016) High-Throughput Crystallography: Reliable and Efficient Identification of Fragment Hits. *Structure* **24**, 1398-1409.
- [8] Klebe, G. (2000) Recent Developments in Structure-Based Drug Design. *J. Mol. Med.* **78**, 269-281.
- [9] Klebe, G. (2009). Wirkstoffdesign - Entwurf und Wirkung von Arzneistoffen. Heidelberg: Spektrum Akademischer Verlag.
- [10] Lipinski, C. A., Lombardo, F., Dominy, B. W. & Feeney, P. J. (1997) Experimental and Computational Approaches to Estimate Solubility and Permeability in Drug Discovery and Development Settings. *Adv. Drug Delivery Rev.* **23**, 3-25.
- [11] Paul, S. M., Mytelka, D. S., Dunwiddie, C. T., Persinger, C. C., Munos, B. H., Lindborg, S. R. & Schacht, A. L. (2010) How to Improve R&D Productivity: the Pharmaceutical Industry's Grand Challenge. *Nat. Rev. Drug Discovery* **9**, 203-214.
- [12] Hörtnner, S. R., Ritschel, T., Stengl, B., Kramer, C., Schweizer, W. B., Wagner, B., Kansy, M., Klebe, G. & Diederich, F. (2007) Potent Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase, an Enzyme linked to the Pathogenicity of the *Shigella* Bacterium: Charge-Assisted Hydrogen Bonding. *Angew. Chem. Int. Ed.* **46**, 8266-8269.
- [13] Ritschel, T., Kohler, P. C., Neudert, G., Heine, A., Diederich, F. & Klebe, G. (2009) How to Replace the Residual Solvation Shell of Polar Active Site Residues to Achieve Nanomolar Inhibition of tRNA-Guanine Transglycosylase. *ChemMedChem* **4**, 2012-2023.
- [14] Kohler, P. C., Ritschel, T., Schweizer, W. B., Klebe, G. & Diederich, F. (2009) High-Affinity Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase Replacing the Function of a Structural Water Cluster. *Chem. Eur. J.* **15**, 10809-10817.
- [15] Ritschel, T., Atmanene, C., Reuter, K., Van Dorsselaer, A., Sanglier-Cianferani, S. & Klebe, G. (2009) An Integrative Approach Combining Noncovalent Mass Spectrometry, Enzyme Kinetics

13. Referenzen

- and X-Ray Crystallography to Decipher Tgt Protein-Protein and Protein-RNA Interaction. *J. Mol. Biol.* **393**, 833-847.
- [16] Xie, W., Liu, X. & Huang, R. H. (2003) Chemical Trapping and Crystal Structure of a Catalytic tRNA Guanine Transglycosylase Covalent Intermediate. *Nat. Struct. Biol.* **10**, 781-788.
- [17] Stengl, B., Reuter, K. & Klebe, G. (2005) Mechanism and Substrate Specificity of tRNA-Guanine Transglycosylases (TGTs): tRNA-Modifying Enzymes From the Three Different Kingdoms of Life Share a Common Catalytic Mechanism. *ChemBioChem.* **6**, 1926-1939.
- [18] Berg, T. (2003) Modulation of Protein-Protein Interactions with Small Organic Molecules. *Angew. Chem., Int. Ed.* **42**, 2462-2481.
- [19] Arkin, M. R. & Wells, J. A. (2004) Small-Molecule Inhibitors of Protein-Protein Interactions: Progressing Towards the Dream. *Nat. Rev. Drug Discovery* **3**, 301-317.
- [20] Yin, H. & Hamilton, A. D. (2005) Strategies for Targeting Protein-Protein Interactions With Synthetic Agents. *Angew. Chem., Int. Ed.* **44**, 4130-4163.
- [21] Wells, J. A. & McClendon, C. L. (2007) Reaching for high-hanging fruit in drug discovery at protein-protein interfaces. *Nature* **450**, 1001-1009.
- [22] Bogan, A. A. & Thorn, K. S. (1998) Anatomy of Hot Spots in Protein Interfaces. *J. Mol. Biol.* **280**, 1-9.
- [23] Moreira, I. S., Fernandes, P. A. & Ramos, M. J. (2007) Hot Spots—A Review of the Protein-Protein Interface Determinant Amino-Acid Residues. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **68**, 803-812.
- [24] Liu, Q. & Li, J. (2010) Protein Binding Hot Spots and the Residue-Residue Pairing Preference: A Water Exclusion Perspective. *BMC Bioinf.* **11**, 244-244.
- [25] Jakobi, S., Nguyen, P. T. X., Debaene, F., Cianférani, S., Reuter, K. & Klebe, G. (2015) What Glues a Homodimer Together: Systematic Analysis of the Stabilizing Effect of an Aromatic Hot Spot in the Protein-Protein Interface of the tRNA-Modifying Enzyme Tgt. *ACS Chem. Biol.* **10**, 1897-1907.
- [26] Jakobi, S., Nguyen, T. X. P., Debaene, F., Metz, A., Sanglier-Cianférani, S., Reuter, K. & Klebe, G. (2014) Hot-Spot Analysis to Dissect the Functional Protein-Protein Interface of a tRNA-Modifying Enzyme. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **82**, 2713-2732.
- [27] Immekus, F., Barandun, L. J., Betz, M., Debaene, F., Petiot, S., Sanglier-Cianferani, S., Reuter, K., Diederich, F. & Klebe, G. (2013) Launching Spiking Ligands into a Protein-Protein Interface: A Promising Strategy To Destabilize and Break Interface Formation in a tRNA Modifying Enzyme. *ACS Chem. Biol.* **8**, 1163-1178.
- [28] Niyogi, S. K. (2005) Shigellosis. *J. Microbiol.* **43**, 133-143.
- [29] Levine, M. M., DuPont, H. L., Formal, S. B., Hornick, R. B., Takeuchi, A., Gangarosa, E. J., Snyder, M. J. & Libonati, J. P. (1973) Pathogenesis of *Shigella dysenteriae* 1 (*Shiga*) Dysentery. *J. Infect. Dis.* **127**, 261-270.
- [30] DuPont, H. L., Levine, M. M., Hornick, R. B. & Formal, S. B. (1989) Inoculum Size in Shigellosis and Implications for Expected Mode of Transmission. *J. Infect. Dis.* **159**, 1126-1128.
- [31] Kotloff, K. L., Winickoff, J. P., Ivanoff, B., Clemens, J. D., Swerdlow, D. L., Sansonetti, P. J., Adak, G. K. & Levine, M. M. (1999) Global Burden of *Shigella* Infections: Implications for Vaccine Development and Implementation of Control Strategies. *B. World Health Organ.* **77**, 651-666.
- [32] Sansonetti, P. J. (2001) Rupture, Invasion and Inflammatory Destruction of the Intestinal Barrier by *Shigella*, Making Sense of Prokaryote-Eukaryote Cross-Talks. *FEMS Microbiol. Rev.* **25**, 3-14.
- [33] WHO (2009). Initiative for Vaccine Research (IVR): Diarrhoeal Diseases (Updated February 2009). World Health Organization.
- [34] Ram, P. K., Crump, J. A., Gupta, S. K., Miller, M. A. & Mintz, E. D. (2008) Part II. Analysis of Data Gaps Pertaining to *Shigella* Infections in Low and Medium Human Development Index Countries, 1984-2005. *Epidemiol. Infect.* **136**, 577-603.

13. Referenzen

- [35] Bowen, A., Hurd, J., Hoover, C., Khachadourian, Y., Traphagen, E., Harvey, E., Libby, T., Ehlers, S., Ongpin, M., Norton, J. C., Bicknese, A. & Kimura, A. (2015) Importation and Domestic Transmission of *Shigella Sonnei* Resistant to Ciprofloxacin - United States, May 2014-February 2015. *MMWR Morb Mortal Wkly Rep.* **64**, 318-320.
- [36] Hyams, K. C., Bourgeois, A. L., Merrell, B. R., Rozmajzl, P., Escamilla, J., Thornton, S. A., Wasserman, G. M., Burke, A., Echeverria, P., Green, K. Y., Kapikian, A. Z. & Woody, J. N. (1991) Diarrheal Disease during Operation Desert Shield. *N. Engl. J. Med.* **325**, 1423-1428.
- [37] Naghavi, Wang, Lozano, Davis, Liang, Zhou, Vollset, Ozgoren, Abdalla, Abd-Allah, Abdel Aziz, Abera & Aboyans (2015) Global, Regional, and National Age-Sex Specific All-Cause and Cause-Specific Mortality for 240 Causes of Death, 1990-2013: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study 2013. *Lancet* **385**, 117-171.
- [38] Mandal, J., V, G., Emelda, J., S, M. & Parija, S. C. (2012) The Recent Trends of Shigellosis: A JIPMER Perspective. *J. Clin. Diagn. Res.* **6**, 1474-1477.
- [39] WHO (2005). Guidelines for the Control of Shigellosis, Including Epidemics due to *Shigella dysenteriae* type 1. Geneva: World Health Organization.
- [40] von Seidlein, L., Kim, D. R., Ali, M., Lee, H., Wang, X., Thiem, V. D., Canh do, G., Chaicumpa, W., Agtini, M. D., Hossain, A., Bhutta, Z. A., Mason, C., Sethabutr, O., Talukder, K., Nair, G. B., Deen, J. L., Kotloff, K. & Clemens, J. (2006) A Multicentre Study of *Shigella* Diarrhoea in Six Asian Countries: Disease Burden, Clinical Manifestations, and Microbiology. *PLoS medicine* **3**, e353.
- [41] Sack, R. B., Rahman, M., Yunus, M. & Khan, E. H. (1997) Antimicrobial Resistance in Organisms Causing Diarrheal Disease. *Clin. Infect. Dis.* **24**, S102-S105.
- [42] Nüsch-Inderbinen, M., Heini, N., Zurfluh, K., Althaus, D., Hächler, H. & Stephan, R. (2016) *Shigella* Antimicrobial Drug Resistance Mechanisms, 2004-2014. *Emerg. Infect. Dis.* **22**, 1083-1085.
- [43] Launay, O., Sadorge, C., Jolly, N., Poirier, B., Béchet, S., van der Vliet, D., Seffer, V., Fenner, N., Dowling, K., Giemza, R., Johnson, J., Ndiaye, A., Vray, M., Sansonetti, P., Morand, P., Poyart, C., Lewis, D. & Gougeon, M.-L. (2009) Safety and Immunogenicity of SC599, an Oral Live Attenuated *Shigella dysenteriae* type-1 Vaccine in Healthy Volunteers: Results of a Phase 2, Randomized, Double-Blind Placebo-Controlled Trial. *Vaccine* **27**, 1184-1191.
- [44] Riddle, M. S. (2015). Safety and Tolerability of a Bioconjugate Vaccine Against *Shigella Flexneri 2a*, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02388009> LimmaTech Biologics AG.
- [45] Kaminski, R. W., Wu, M., Turbyfill, K. R., Clarkson, K., Tai, B., Bourgeois, A. L., Van De Verg, L. L., Walker, R. I. & Oaks, E. V. (2014) Development and Preclinical Evaluation of a Trivalent, Formalin-Inactivated *Shigella* Whole-Cell Vaccine. *Clin. Vaccine Immunol.* **21**, 366-382.
- [46] Duplessis, C. (2016). Safety and Immunogenicity of Artificial Invaplex (*Shigella Flexneri 2a* InvaplexAR) Administered Intranasally to Healthy, Adult Volunteers, <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02445963>, U.S. Army Medical Research and Materiel Command.
- [47] Lan, R. & Reeves, P. R. (2002) *Escherichia coli* in Disguise: Molecular Origins of *Shigella*. *Microbes Infect.* **4**, 1125-1132.
- [48] Peng, J., Yang, J. & Jin, Q. (2009) The Molecular Evolutionary History of *Shigella* spp. and Enteroinvasive *Escherichia coli*. *Infect., Genet. Evol.* **9**, 147-152.
- [49] Ewing, W. H. (1949) *Shigella* Nomenclature. *J. Bacteriol.* **57**, 633-638.
- [50] Donohue-Rolfe, A., David, W. K. A. & Keusch, G. T. (1991) *Shiga* Toxin: Purification, Structure, and Function. *Rev. Infect. Dis.* **13**, S293-S297.
- [51] Suerbaum, S., Hahn, H., Burchard, G.-D., Kaufmann, S. H. E. & Schulz, T. F. (2012). Medizinische Mikrobiologie und Infektiologie. Springer-Verlag Berlin Heidelberg.
- [52] Escobar-Páramo, P., Clermont, O., Blanc-Potard, A.-B., Bui, H., Le Bouguénec, C. & Denamur, E. (2004) A Specific Genetic Background Is Required for Acquisition and Expression of Virulence Factors in *Escherichia coli*. *Mol. Biol. Evol.* **21**, 1085-1094.

13. Referenzen

- [53] Campilongo, R., Di Martino, M. L., Marcocci, L., Pietrangeli, P., Leuzzi, A., Grossi, M., Casalino, M., Nicoletti, M., Micheli, G., Colonna, B. & Prosseda, G. (2014) Molecular and Functional Profiling of the Polyamine Content in Enteroinvasive *E. coli* : Looking into the Gap between Commensal *E. coli* and Harmful *Shigella*. *PloS one* **9**, e106589.
- [54] Gajiwala, K. S. & Burley, S. K. (2000) HDEA, a Periplasmic Protein that Supports Acid Resistance in Pathogenic Enteric Bacteria. *J. Mol. Biol.* **295**, 605-612.
- [55] Lin, J., Lee, I. S., Frey, J., Slonczewski, J. L. & Foster, J. W. (1995) Comparative Analysis of Extreme Acid Survival in *Salmonella typhimurium*, *Shigella flexneri*, and *Escherichia coli*. *J. Bacteriol.* **177**, 4097-4104.
- [56] Jennison, A. V. & Verma, N. K. (2004) *Shigella flexneri* Infection: Pathogenesis and Vaccine Development. *FEMS Microbiol. Rev.* **28**, 43-58.
- [57] Schröder, G. N. & Hilbi, H. (2008) Molecular Pathogenesis of *Shigella* spp.: Controlling Host Cell Signaling, Invasion, and Death by Type III Secretion. *Clin. Microbiol. Rev.* **21**, 134-156.
- [58] Fernandez, M. I. & Sansonetti, P. J. (2003) *Shigella* Interaction with Intestinal Epithelial Cells Determines the Innate Immune Response in Shigellosis. *Int. J. Med. Microbiol.* **293**, 55-67.
- [59] Tran Van Nhieu, G., Bourdet-Sicard, R., Duménil, G., Blocker, A. & Sansonetti, P. J. (2000) Bacterial Signals and Cell Responses During *Shigella* Entry into Epithelial Cells. *Cell. Microbiol.* **2**, 187-193.
- [60] Suzuki, T., Saga, S. & Sasakawa, C. (1996) Functional Analysis of *Shigella* VirG Domains Essential for Interaction with Vinculin and Actin-based Motility. *J. Biol. Chem.* **271**, 21878-21885.
- [61] Laine, R. O., Zeile, W., Kang, F., Purich, D. L. & Southwick, F. S. (1997) Vinculin Proteolysis Unmasks an ActA Homolog for Actin-based *Shigella* Motility. *J. Cell Biol.* **138**, 1255-1264.
- [62] Suzuki, T. & Sasakawa, C. (1998) N-WASP is an Important Protein for the Actin-Based Motility of *Shigella flexneri* in the Infected Epithelial Cells. *Jpn. J. Med. Sci. Biol.* **51**, S63-S68.
- [63] Egile, C., Loisel, T. P., Laurent, V., Li, R., Pantaloni, D., Sansonetti, P. J. & Carlier, M.-F. (1999) Activation of the Cdc42 Effector N-Wasp by the *Shigella flexneri* IcsA Protein Promotes Actin Nucleation by Arp2/3 Complex and Bacterial Actin-Based Motility. *J. Biol. Chem.* **146**, 1319-1332.
- [64] Dorman, C. J. & Porter, M. E. (1998) The *Shigella* Virulence Gene Regulatory Cascade: A Paradigm of Bacterial Gene Control Mechanisms. *Mol. Microbiol.* **29**, 677-684.
- [65] Durand, J. M. B., Dagberg, B., Uhlin, B. E. & Björk, G. R. (2000) Transfer RNA Modification, Temperature and DNA Superhelicity have a Common Target in the Regulatory Network of the Virulence of *Shigella flexneri*: The Expression of the *virF* Gene. *Mol. Microbiol.* **35**, 924-935.
- [66] Durand, J. M. B., Okada, N., Tobe, T., Watarai, M., Fukuda, I., Suzuki, T., Nakata, N., Komatsu, K., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1994) *vacC*, a Virulence-Associated Chromosomal Locus of *Shigella flexneri*, is Homologous to *tgt*, a Gene Encoding tRNA-Guanine Transglycosylase (Tgt) of *Escherichia coli* K-12. *J. Bacteriol.* **176**, 4627-4634.
- [67] Durand, J. M. B., Björk, G. R., Kuwae, A., Yoshikawa, M. & Sasakawa, C. (1997) The Modified Nucleoside 2-Methylthio-N⁶-isopentenyladenosine in tRNA of *Shigella flexneri* is Required for Expression of Virulence Genes. *J. Bacteriol.* **179**, 5777-5782.
- [68] Okada, N. & Nishimura, S. (1979) Isolation and Characterization of a Guanine Insertion Enzyme, a Specific tRNA Transglycosylase, from *Escherichia coli*. *J. Biol. Chem.* **254**, 3061-3066.
- [69] Reuter, K. & Ficner, R. (1995) Sequence Analysis and Overexpression of the *Zymomonas mobilis* *tgt* Gene Encoding tRNA-Guanine Transglycosylase: Purification and Biochemical Characterization of the Enzyme. *J. Bacteriol.* **177**, 5284-5288.
- [70] Romier, C., Ficner, R., Reuter, K. & Suck, D. (1996) Purification, Crystallization, and Preliminary X-Ray Diffraction Studies of tRNA-Guanine Transglycosylase from *Zymomonas mobilis*. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **24**, 516-519.
- [71] Romier, C., Reuter, K., Suck, D. & Ficner, R. (1996) Crystal Structure of tRNA-Guanine Transglycosylase: RNA Modification by Base Exchange. *EMBO J.* **15**, 2850-2857.

13. Referenzen

- [72] Hoagland, M. B., Zamecnik, P. C. & Stephenson, M. L. (1957) Intermediate Reactions in Protein Biosynthesis. *Biochim. Biophys. Acta* **24**, 215-216.
- [73] Crain, P. F. & McCloskey, J. A. (1997) The RNA modification Database. *Nucleic Acids Res.* **25**, 126-127.
- [74] Levene, P. A. (1919) The Structure of Yeast Nucleic Acid: IV. Ammonia Hydrolysis. *J. Biol. Chem.* **40**, 415-424.
- [75] Reader, J. S., Metzgar, D., Schimmel, P. & de Crécy-Lagard, V. (2004) Identification of Four Genes Necessary for Biosynthesis of the Modified Nucleoside Queuosine. *J. Biol. Chem.* **279**, 6280-6285.
- [76] Hoops, G. C., Townsend, L. B. & Garcia, G. A. (1995) tRNA-Guanine Transglycosylase from *Escherichia coli*: Structure-Activity Studies Investigating the Role of the Aminomethyl Substituent of the Heterocyclic Substrate PreQ₁. *Biochemistry* **34**, 15381-15387.
- [77] Phillips, G., El Yacoubi, B., Lyons, B., Alvarez, S., Iwata-Reuyl, D. & de Crécy-Lagard, V. (2008) Biosynthesis of 7-Deazaguanosine-modified tRNA Nucleosides: A New Role for GTP Cyclohydrolase I. *J. Bacteriol.* **190**, 7876-7884.
- [78] McCarty, R. M., Somogyi, Á. & Bandarian, V. (2009) *E. coli* QueD is a 6-Carboxy-5,6,7,8-tetrahydropterin Synthase. *Biochemistry* **48**, 2301-2303.
- [79] McCarty, R. M., Somogyi, Á., Lin, G., Jacobsen, N. E. & Bandarian, V. (2009) The Deazapurine Biosynthetic Pathway Revealed: *In vitro* Enzymatic Synthesis of preQ₀ from Guanosine-5'-triphosphate in Four Steps. *Biochemistry* **48**, 3847-3852.
- [80] Lee, B. W. K., Van Lanen, S. G. & Iwata-Reuyl, D. (2007) Mechanistic Studies of *Bacillus subtilis* QueF, the Nitrile Oxidoreductase Involved in Queuosine Biosynthesis. *Biochemistry* **46**, 12844-12854.
- [81] Van Lanen, S. G., Kinzie, S. D., Matthieu, S., Link, T., Culp, J. & Iwata-Reuyl, D. (2003) tRNA Modification by S-Adenosylmethionine:tRNA Ribosyltransferase-Isomerase. Assay Development and Characterization of the Recombinant Enzyme. *J. Biol. Chem.* **278**, 10491-10499.
- [82] Frey, B., McCloskey, J., Kersten, W. & Kersten, H. (1988) New Function of Vitamin B12: Cobamide-Dependent Reduction of Epoxyqueuosine to Queuosine in tRNAs of *Escherichia coli* and *Salmonella typhimurium*. *J. Bacteriol.* **170**, 2078-2082.
- [83] Biela, I., Tidten-Luksch, N., Immekus, F., Glinca, S., Nguyen, T. X., Gerber, H. D., Heine, A., Klebe, G. & Reuter, K. (2013) Investigation of Specificity Determinants in Bacterial tRNA-Guanine Transglycosylase Reveals Queuine, the Substrate of its Eucaryotic Counterpart, as Inhibitor. *PLoS one* **8**, e64240.
- [84] Chen, Y. C., Brooks, A. F., Goodenough-Lashua, D. M., Kittendorf, J. D., Showalter, H. D. & Garcia, G. A. (2011) Evolution of Eukaryal tRNA-Guanine Transglycosylase: Insight Gained from the Heterocyclic Substrate Recognition by the Wild-Type and Mutant Human and *Escherichia coli* tRNA-Guanine Transglycosylases. *Nucleic Acids Res.* **39**, 2834-2844.
- [85] Iwata-Reuyl, D. (2003) Biosynthesis of the 7-Deazaguanosine Hypermodified Nucleosides of transfer RNA. *Bioorg. Chem.* **31**, 24-43.
- [86] Brenk, R., Stubbs, M. T., Heine, A., Reuter, K. & Klebe, G. (2003) Flexible Adaptations in the Structure of the tRNA-modifying enzyme tRNA-guanine Transglycosylase and their Implications for Substrate Selectivity, Reaction Mechanism and Structure-Based Drug Design. *ChemBioChem* **4**, 1066-1077.
- [87] Wierenga, R. K. (2001) The TIM-Barrel Fold: A Versatile Framework for Efficient Enzymes. *FEBS Lett.* **492**, 193-198.
- [88] Curnow, A. W. & Garcia, G. A. (1995) tRNA-Guanine Transglycosylase from *Escherichia coli*. Minimal tRNA Structure and Sequence Requirements for Recognition. *J. Biol. Chem.* **270**, 17264-17267.
- [89] Grädler, U., Gerber, H.-D., Goodenough-Lashua, D. M., Garcia, G. A., Ficner, R., Reuter, K., Stubbs, M. T. & Klebe, G. (2001) A New Target for Shigellosis: Rational Design and

13. Referenzen

- Crystallographic Studies of Inhibitors of tRNA-Guanine Transglycosylase. *J. Mol. Biol.* **306**, 455-467.
- [90] Bissantz, C., Kuhn, B. & Stahl, M. (2010) A Medicinal Chemist's Guide to Molecular Interactions. *Journal of medicinal chemistry* **53**, 5061-5084.
- [91] Hirsch, A. K. H., Fischer, F. R. & Diederich, F. (2007) Phosphate Recognition in Structural Biology. *Angew. Chem., Int. Ed.* **46**, 338-352.
- [92] Hunter, T. (1995) Protein Kinases and Phosphatases: The Yin and Yang of Protein Phosphorylation and Signaling. *Cell* **80**, 225-236.
- [93] Quiocho, F. A., Wilson, D. K. & Vyas, N. K. (1989) Substrate Specificity and Affinity of a Protein Modulated by Bound Water Molecules. *Nature* **340**, 404-407.
- [94] Dunitz, J. D. (1994) The Entropic Cost of Bound Water in Crystals and Biomolecules. *Science* **264**, 670-670.
- [95] Ladbury, J. E. (1996) Just Add Water! The Effect of Water on the Specificity of Protein-Ligand Binding Sites and its Potential Application to Drug Design. *Chemistry & biology* **3**, 973-980.
- [96] Barillari, C., Taylor, J., Viner, R. & Essex, J. W. (2007) Classification of Water Molecules in Protein Binding Sites. *J. Am. Chem. Soc.* **129**, 2577-2587.
- [97] Ball, P. (2008) Water as an Active Constituent in Cell Biology. *Chem. Rev.* **108**, 74-108.
- [98] Michel, J., Tirado-Rives, J. & Jorgensen, W. L. (2009) Energetics of Displacing Water Molecules from Protein Binding Sites: Consequences for Ligand Optimization. *J. Am. Chem. Soc.* **131**, 15403-15411.
- [99] Ellermann, M., Jakob-Roetne, R., Lerner, C., Borroni, E., Schlatter, D., Roth, D., Ehler, A., Rudolph, M. G. & Diederich, F. (2009) Molecular Recognition at the Active Site of Catechol-o-Methyltransferase: Energetically Favorable Replacement of a Water Molecule Imported by a Bisubstrate Inhibitor. *Angew. Chem., Int. Ed.* **48**, 9092-9096.
- [100] Breiten, B., Lockett, M. R., Sherman, W., Fujita, S., Al-Sayah, M., Lange, H., Bowers, C. M., Heroux, A., Krilov, G. & Whitesides, G. M. (2013) Water Networks Contribute to Enthalpy/Entropy Compensation in Protein-Ligand Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **135**, 15579-15584.
- [101] Krimmer, S. G., Betz, M., Heine, A. & Klebe, G. (2014) Methyl, Ethyl, Propyl, Butyl: Futile but not for Water, as the Correlation of Structure and Thermodynamic Signature Shows in a Congeneric Series of Thermolysin Inhibitors. *ChemMedChem* **9**, 833-846.
- [102] García-Sosa, A. T., Mancera, R. L. & Dean, P. M. (2003) WaterScore: A Novel Method for Distinguishing Between Bound and Displaceable Water Molecules in the Crystal Structure of the Binding Site of Protein-Ligand Complexes. *J. Mol. Model.* **9**, 172-182.
- [103] Verdonk, M. L., Chessari, G., Cole, J. C., Hartshorn, M. J., Murray, C. W., Nissink, J. W. M., Taylor, R. D. & Taylor, R. (2005) Modeling Water Molecules in Protein-Ligand Docking Using GOLD. *J. Med. Chem.* **48**, 6504-6515.
- [104] Roberts, B. C. & Mancera, R. L. (2008) Ligand-Protein Docking with Water Molecules. *J. Chem. Inf. Model.* **48**, 397-408.
- [105] Amadasi, A., Surface, J. A., Spyraakis, F., Cozzini, P., Mozzarelli, A. & Kellogg, G. E. (2008) Robust Classification of "Relevant" Water Molecules in Putative Protein Binding Sites. *J. Med. Chem.* **51**, 1063-1067.
- [106] Beuming, T., Farid, R. & Sherman, W. (2009) High-Energy Water Sites Determine Peptide Binding Affinity and Specificity of PDZ Domains. *Protein Sci.* **18**, 1609-1619.
- [107] de Beer, S. B. A., Vermeulen, N., P. E. & Oostenbrink, C. (2010) The Role of Water Molecules in Computational Drug Design. *Curr. Top. Med. Chem.* **10**, 55-66.
- [108] Robinson, D. D., Sherman, W. & Farid, R. (2010) Understanding Kinase Selectivity Through Energetic Analysis of Binding Site Waters. *ChemMedChem* **5**, 618-627.
- [109] Wang, L., Berne, B. J. & Friesner, R. A. (2011) Ligand Binding to Protein-Binding Pockets with Wet and Dry Regions. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **108**, 1326-1330.
- [110] Marteyn, B., Gazi, A. & Sansonetti, P. (2012) *Shigella*: A Model of Virulence Regulation *in vivo*. *Gut Microbes* **3**, 104-120.

13. Referenzen

- [111] Sansonetti, P. J. (2006) Shigellosis: An Old Disease in New Clothes? *PLoS medicine* **3**, e354.
- [112] McCarty, R. M. & Bandarian, V. (2012) Biosynthesis of Pyrrolopyrimidines. *Bioorg. Chem.* **43**, 15-25.
- [113] Meyer, E. A., Donati, N., Guillot, M., Schweizer, W. B., Diederich, F., Stengl, B., Brenk, R., Reuter, K. & Klebe, G. (2006) Synthesis, Biological Evaluation, and Crystallographic Studies of Extended Guanine-Based (*lin*-Benzoguanine) Inhibitors for tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT). *Helv. Chim. Acta* **89**, 573-597.
- [114] Barandun, L. J., Immekus, F., Kohler, P. C., Tonazzi, S., Wagner, B., Wendelspiess, S., Ritschel, T., Heine, A., Kansy, M., Klebe, G. & Diederich, F. (2012) From *lin*-Benzoguanines to *lin*-Benzohypoxanthines as Ligands for *Zymomonas mobilis* tRNA-Guanine Transglycosylase: Replacement of Protein-Ligand Hydrogen Bonding by Importing Water Clusters. *Chem. Eur. J.* **18**, 9246-9257.
- [115] Ritschel, T., Hörtner, S., Heine, A., Diederich, F. & Klebe, G. (2009) Crystal Structure Analysis and *in silico* pK_a Calculations Suggest Strong pK_a Shifts of Ligands as Driving Force for High-Affinity Binding to TGT. *Chembiochem.* **10**, 716-727.
- [116] Barandun, L. J., Immekus, F., Kohler, P. C., Ritschel, T., Heine, A., Orlando, P., Klebe, G. & Diederich, F. (2013) High-Affinity Inhibitors of *Zymomonas mobilis* tRNA-Guanine Transglycosylase through Convergent Optimization. *Acta Crystallogr., Sect. D* **69**, 1798-1807.
- [117] Grüner, S., Neeb, M., Barandun, L. J., Sielaff, F., Hohn, C., Kojima, S., Steinmetzer, T., Diederich, F. & Klebe, G. (2014) Impact of Protein and Ligand Impurities on ITC-Derived Protein-Ligand Thermodynamics. *Biochim. Biophys. Acta* **1840**, 2843-2850.
- [118] Neeb, M., Czodrowski, P., Heine, A., Barandun, L. J., Hohn, C., Diederich, F. & Klebe, G. (2014) Chasing Protons: How Isothermal Titration Calorimetry, Mutagenesis, and pK_a Calculations Trace the Locus of Charge in Ligand Binding to a tRNA-Binding Enzyme. *J. Med. Chem.* **57**, 5554-5565.
- [119] Neeb, M., Betz, M., Heine, A., Barandun, L. J., Hohn, C., Diederich, F. & Klebe, G. (2014) Beyond Affinity: Enthalpy-Entropy Factorization Unravels Complexity of a Flat Structure-Activity Relationship for Inhibition of a tRNA-Modifying Enzyme. *J. Med. Chem.* **57**, 5566-5578.
- [120] Riniker, S., Barandun, L. J., Diederich, F., Kramer, O., Steffen, A. & van Gunsteren, W. F. (2012) Free Enthalpies of Replacing Water Molecules in Protein Binding Pockets. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **26**, 1293-1309.
- [121] Minke, W. E., Diller, D. J., Hol, W. G. J. & Verlinde, C. L. M. J. (1999) The Role of Waters in Docking Strategies with Incremental Flexibility for Carbohydrate Derivatives: Heat-Labile Enterotoxin, a Multivalent Test Case. *J. Med. Chem.* **42**, 1778-1788.
- [122] Clarke, C., Woods, R. J., Gluska, J., Cooper, A., Nutley, M. A. & Boons, G.-J. (2001) Involvement of Water in Carbohydrate-Protein Binding. *J. Am. Chem. Soc.* **123**, 12238-12247.
- [123] Tschampel, S. M. & Woods, R. J. (2003) Quantifying the Role of Water in Protein-Carbohydrate Interactions. *J. Phys. Chem. A* **107**, 9175-9181.
- [124] Daranas, A. H., Shimizu, H. & Homans, S. W. (2004) Thermodynamics of Binding of d-Galactose and Deoxy Derivatives thereof to the l-Arabinose-Binding Protein. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 11870-11876.
- [125] Li, Z. & Lazaridis, T. (2005) The Effect of Water Displacement on Binding Thermodynamics: Concanavalin A. *J. Phys. Chem. B* **109**, 662-670.
- [126] Saraboji, K., Håkansson, M., Genheden, S., Diehl, C., Qvist, J., Weininger, U., Nilsson, U. J., Leffler, H., Ryde, U., Akke, M. & Logan, D. T. (2012) The Carbohydrate-Binding Site in Galectin-3 Is Preorganized To Recognize a Sugarlike Framework of Oxygens: Ultra-High-Resolution Structures and Water Dynamics. *Biochemistry* **51**, 296-306.
- [127] ACD/Labs, Version 12.01 (2009). Toronto, Canada: Advanced Chemistry Development, Inc.
- [128] Mannhold, R., Poda, G. I., Ostermann, C. & Tetko, I. V. (2009) Calculation of Molecular Lipophilicity: State-of-the-Art and Comparison of Log P Methods on more than 96,000 Compounds. *J. Pharm. Sci.* **98**, 861-893.

13. Referenzen

- [129] van de Waterbeemd, H., Lennernas, H., Artursson, L., Mannhold, R., Kubinyi, H. & Folkers, G. (2006). Drug Bioavailability: Estimation of Solubility, Permeability, Absorption and Bioavailability. Weinheim: Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA.
- [130] Taha, H. A., Richards, M. R. & Lowary, T. L. (2013) Conformational Analysis of Furanoside-Containing Mono- and Oligosaccharides. *Chem. Rev.* **113**, 1851-1876.
- [131] Goodenough-Lashua, D. M. & Garcia, G. A. (2003) tRNA–Guanine Transglycosylase from *E. coli*: A Ping-Pong Kinetic Mechanism is Consistent with Nucleophilic Catalysis. *Bioorg. Chem.* **31**, 331-344.
- [132] Rye, C. S. & Baell, J. B. (2005) Phosphate Isosteres in Medicinal Chemistry. *Curr. Med. Chem.* **12**, 3127-3141.
- [133] Meanwell, N. A. (2011) Synopsis of Some Recent Tactical Application of Bioisosteres in Drug Design. *J. Med. Chem.* **54**, 2529-2591.
- [134] Elliott, T. S., Slowey, A., Ye, Y. & Conway, S. J. (2012) The Use of Phosphate Bioisosteres in Medicinal Chemistry and Chemical Biology. *MedChemComm* **3**, 735.
- [135] Okada, N., Noguchi, S., Kasai, H., Shindo-Okada, N., Ohgi, T., Goto, T. & Nishimura, S. (1979) Novel Mechanism of Post-Transcriptional Modification of tRNA. Insertion of Bases of Q Precursors into tRNA by a Specific tRNA Transglycosylase Reaction. *J. Biol. Chem.* **254**, 3067-3073.
- [136] Yang, C., Li, P., Zhang, X., Ma, Q., Cui, X., Li, H., Liu, H., Wang, J., Xie, J., Wu, F., Sheng, C., Du, X., Qi, L., Su, W., Jia, L., Xu, X., Zhao, J., Xia, S., Zhou, N., Ma, H., Qiu, S. & Song, H. (2016) Molecular Characterization and Analysis of High-Level Multidrug-Resistance of *Shigella flexneri* Serotype 4s Strains from China. *Sci Rep.* **6**, 29124.
- [137] Stengl, B., Meyer, E. A., Heine, A., Brenk, R., Diederich, F. & Klebe, G. (2007) Crystal structures of tRNA-Guanine Transglycosylase (TGT) in Complex with Novel and Potent Inhibitors Unravel Pronounced Induced-Fit Adaptations and Suggest Dimer Formation Upon Substrate Binding. *J. Mol. Biol.* **370**, 492-511.
- [138] Krissinel, E. & Henrick, K. (2007) Inference of Macromolecular Assemblies From Crystalline State. *J. Mol. Biol.* **372**, 774-797.
- [139] Sheriff, S., Hendrickson, W. A. & Smith, J. L. (1987) Structure of Myohemerythrin in the Azidomet State at 1.7/1.3 Å Resolution. *J. Mol. Biol.* **197**, 273-296.
- [140] Sheriff, S. (1993) Some Methods for Examining the Interactions Between Two Molecules. *ImmunoMethods* **3**, 191-196.
- [141] Wiseman, T., Williston, S., Brandts, J. F. & Lin, L.-N. (1989) Rapid Measurement of Binding Constants and Heats of Binding Using a New Titration Calorimeter. *Anal. Biochem.* **179**, 131-137.
- [142] Ladbury, J. E. & Chowdhry, B. Z. (1996) Sensing the Heat: The Application of Isothermal Titration Calorimetry to Thermodynamic Studies of Biomolecular Interactions. *Chem. Biol.* **3**, 791-801.
- [143] Dunitz, J. D. (1995) Win Some, Lose Some: Enthalpy-Entropy Compensation in Weak Intermolecular Interactions. *Chem. Biol.* **2**, 709-712.
- [144] Jelesarov, I. & Bosshard, H. R. (1999) Isothermal Titration Calorimetry and Differential Scanning Calorimetry as Complementary Tools to Investigate the Energetics of Biomolecular Recognition. *J. Mol. Recognit.* **12**, 3-18.
- [145] Fenley, A. T., Muddana, H. S. & Gilson, M. K. (2012) Entropy–Enthalpy Transduction Caused by Conformational Shifts can Obscure the Forces Driving Protein–Ligand Binding. *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* **109**, 20006-20011.
- [146] Albert, A. (1958) Chemical Aspects of Selective Toxicity. *Nature* **182**, 421-423.
- [147] Hann, M. M. & Keserü, G. M. (2012) Finding the Sweet Spot: The Role of Nature and Nurture in Medicinal Chemistry. *Nat. Rev. Drug Discovery* **11**, 355-365.
- [148] Huttunen, K. M. & Rautio, J. (2011) Prodrugs - An Efficient Way to Breach Delivery and Targeting Barriers. *Curr. Top. Med. Chem.* **11**, 2265-2287.

13. Referenzen

- [149] Rautio, J., Kumpulainen, H., Heimbach, T., Oliyai, R., Oh, D., Jarvinen, T. & Savolainen, J. (2008) Prodrugs: Design and Clinical Applications. *Nat. Rev. Drug Discovery* **7**, 255-270.
- [150] Ettmayer, P., Amidon, G. L., Clement, B. & Testa, B. (2004) Lessons Learned from Marketed and Investigational Prodrugs. *J. Med. Chem.* **47**, 2393-2404.
- [151] Beaumont, K., Webster, R., Gardner, I. & Dack, K. (2003) Design of Ester Prodrugs to Enhance Oral Absorption of Poorly Permeable Compounds: Challenges to the Discovery Scientist. *Curr. Drug Metab.* **4**, 461-485.
- [152] Philip, M. P. & Randy, M. W. (2006) Carboxylesterases - Detoxifying Enzymes and Targets for Drug Therapy. *Curr. Med. Chem.* **13**, 1045-1054.
- [153] Yang, C. Y., Dantzig, A. H. & Pidgeon, C. (1999) Intestinal Peptide Transport Systems and Oral Drug Availability. *Pharm. Res.* **16**, 1331-1343.
- [154] Jousserandot, A., Boucher, J.-L., Henry, Y., Niklaus, B., Clement, B. & Mansuy, D. (1998) Microsomal Cytochrome P450 Dependent Oxidation of N-Hydroxyguanidines, Amidoximes, and Ketoximes: Mechanism of the Oxidative Cleavage of Their CN(OH) Bond with Formation of Nitrogen Oxides. *Biochemistry* **37**, 17179-17191.
- [155] Kumpulainen, H., Mähönen, N., Laitinen, M.-L., Jaurakkajärvi, M., Raunio, H., Juvonen, R. O., Vepsäläinen, J., Jarvinen, T. & Rautio, J. (2006) Evaluation of Hydroxyimine as Cytochrome P450-Selective Prodrug Structure. *J. Med. Chem.* **49**, 1207-1211.
- [156] Blech, S., Ebner, T., Ludwig-Schwellinger, E., Stangier, J. & Roth, W. (2008) The Metabolism and Disposition of the Oral Direct Thrombin Inhibitor, Dabigatran, in Humans. *Drug Metab. Dispos.* **36**, 386-399.
- [157] van Ryn, J., Stangier, J., Haertter, S., Liesenfeld, K. H., Wienen, W., Feuring, M. & Clemens, A. (2010) Dabigatran Etxilate – a Novel, Reversible, Oral Direct Thrombin Inhibitor: Interpretation of Coagulation Assays and Reversal of Anticoagulant Activity. *Thromb. Haemostasis* **103**, 1116-1127.
- [158] Siddiqui, F. M. & Qureshi, A. I. (2010) Dabigatran Etxilate, a New Oral Direct Thrombin Inhibitor, for Stroke Prevention in Patients with Atrial Fibrillation. *Expert Opin. Pharmacother.* **11**, 1403-1411.
- [159] Miwa, M., Ura, M., Nishida, M., Sawada, N., Ishikawa, T., Mori, K., Shimma, N., Umeda, I. & Ishitsuka, H. (1998) Design of a Novel Oral Fluoropyrimidine Carbamate, Capecitabine, which Generates 5-Fluorouracil Selectively in Tumours by Enzymes Concentrated in Human Liver and Cancer Tissue. *Eur. J. Cancer* **34**, 1274-1281.
- [160] Sinhababu, A. K. & Thakker, D. R. (1996) Prodrugs of Anticancer Agents. *Adv. Drug Delivery Rev.* **19**, 241-273.
- [161] Walko, C. M. & Lindley, C. (2005) Capecitabine: A Review. *Clin. Ther.* **27**, 23-44.
- [162] Waring, M. J. (2009) Defining Optimum Lipophilicity and Molecular Weight Ranges for Drug Candidates—Molecular Weight Dependent Lower logD Limits Based on Permeability. *Bioorg. Med. Chem. Lett.* **19**, 2844-2851.
- [163] Wenlock, M. C., Austin, R. P., Barton, P., Davis, A. M. & Leeson, P. D. (2003) A Comparison of Physicochemical Property Profiles of Development and Marketed Oral Drugs. *J. Med. Chem.* **46**, 1250-1256.
- [164] Kansy, M., Senner, F. & Gubernator, K. (1998) Physicochemical High Throughput Screening: Parallel Artificial Membrane Permeation Assay in the Description of Passive Absorption Processes. *J. Med. Chem.* **41**, 1007-1010.
- [165] Brandl, M., Eide Flaten, G., Bauer-Brandl, A. & Begley, T. P. (2007). *Wiley Encyclopedia of Chemical Biology*: John Wiley & Sons, Inc.
- [166] Grünberg, R., Leckner, J. & Nilges, M. (2004) Complementarity of Structure Ensembles in Protein-Protein Binding. *Structure* **12**, 2125-2136.
- [167] Meagher, K. L. & Carlson, H. A. (2004) Incorporating Protein Flexibility in Structure-Based Drug Discovery: Using HIV-1 Protease as a Test Case. *J. Am. Chem. Soc.* **126**, 13276-13281.
- [168] Gerstein, M. & Echols, N. (2004) Exploring the Range of Protein Flexibility, From a Structural Proteomics Perspective. *Curr. Opin. Chem. Biol.* **8**, 14-19.

13. Referenzen

- [169] Karplus, M. & McCammon, J. A. (2002) Molecular dynamics simulations of biomolecules. *Nat. Struct. Mol. Biol.* **9**, 646-652.
- [170] Spyraakis, F., Benedetti, P., Decherchi, S., Rocchia, W., Cavalli, A., Alcaro, S., Ortuso, F., Baroni, M. & Cruciani, G. (2015) A Pipeline To Enhance Ligand Virtual Screening: Integrating Molecular Dynamics and Fingerprints for Ligand and Proteins. *J. Chem. Inf. Model.* **55**, 2256-2274.
- [171] Schames, J. R., Henschman, R. H., Siegel, J. S., Sotriffer, C. A., Ni, H. & McCammon, J. A. (2004) Discovery of a Novel Binding Trench in HIV Integrase. *J. Med. Chem.* **47**, 1879-1881.
- [172] Zürcher, M., Gottschalk, T., Meyer, S., Bur, D. & Diederich, F. (2008) Exploring the Flap Pocket of the Antimalarial Target Plasmeprin II: The "55 % Rule" Applied to Enzymes. *ChemMedChem* **3**, 237-240.
- [173] Durrant, J. D., de Oliveira, C. A. F. & McCammon, J. A. (2010) Including Receptor Flexibility and Induced Fit Effects into the Design of MMP-2 Inhibitors. *J. Mol. Recognit.* **23**, 173-182.
- [174] Hicks, C. & Gulick, R. M. (2009) Raltegravir: The First HIV Type 1 Integrase Inhibitor. *Clin. Infect. Dis.* **48**, 931-939.
- [175] Tidten, N. (2008). Structural and Mutational Characterisation of *Shigella* Pathogenicity Factors. Philipps-Universität Marburg.
- [176] Liang, J., Edelsbrunner, H., Fu, P., Sudhakar, P. V. & Subramaniam, S. (1998) Analytical Shape Computation of Macromolecules: I. Molecular Area and Volume Through Alpha Shape. *Proteins: Struct., Funct., Bioinf.* **33**, 1-17.
- [177] Dundas, J., Ouyang, Z., Tseng, J., Binkowski, A., Turpaz, Y. & Liang, J. (2006) CASTp: Computed Atlas of Surface Topography of Proteins with Structural and Topographical Mapping of Functionally Annotated Residues. *Nucleic Acids Res.* **34**, W116-W118.
- [178] Morris, R. C. & Elliott, M. S. (2001) Queuosine modification of tRNA: A Case for Convergent Evolution. *Mol. Genet. Metab.* **74**, 147-159.
- [179] Shindo-Okada, N., Okada, N., Ohgi, T., Goto, T. & Nishimura, S. (1980) Transfer Ribonucleic Acid Guanine Transglycosylase Isolated From Rat Liver. *Biochemistry* **19**, 395-400.
- [180] Romier, C., Meyer, J. E. W. & Suck, D. (1997) Slight Sequence Variations of a Common Fold Explain the Substrate Specificities of tRNA-Guanine Transglycosylases from the Three Kingdoms. *FEBS Lett.* **416**, 93-98.
- [181] Gerber, P. R. & Müller, K. (1995) MAB, a Generally Applicable Molecular Force Field for Structure Modelling in Medicinal Chemistry. *J. Comput.-Aided Mol. Des.* **9**, 251-268.
- [182] Bruno, I. J., Cole, J. C., Edgington, P. R., Kessler, M., Macrae, C. F., McCabe, P., Pearson, J. & Taylor, R. (2002) New Software for Searching the Cambridge Structural Database and Visualizing Crystal Structures. *Acta Crystallogr., Sect. B* **58**, 389-397.
- [183] Vallee, B. L. & Auld, D. S. (1990) Zinc Coordination, Function, and Structure of Zinc Enzymes and other Proteins. *Biochemistry* **29**, 5647-5659.
- [184] Aramini, James M., Hamilton, K., Ma, L.-C., Swapna, G. V. T., Leonard, Paul G., Ladbury, John E., Krug, Robert M. & Montelione, Gaetano T. (2014) ¹⁹F NMR Reveals Multiple Conformations at the Dimer Interface of the Nonstructural Protein 1 Effector Domain from Influenza A Virus. *Structure* **22**, 515-525.
- [185] Levine, M. M., Kotloff, K. L., Barry, E. M., Pasetti, M. F. & Sztein, M. B. (2007) Clinical Trials of *Shigella* Vaccines: Two Steps Forward and One Step Back on a Long, Hard Road. *Nat. Rev. Microbiol.* **5**, 540-553.
- [186] Gu, B., Cao, Y., Pan, S., Zhuang, L., Yu, R., Peng, Z., Qian, H., Wei, Y., Zhao, L., Liu, G. & Tong, M. (2012) Comparison of the Prevalence and Changing Resistance to Nalidixic Acid and Ciprofloxacin of *Shigella* between Europe-America and Asia-Africa from 1998 to 2009. *Int. J. Antimicrob. Agents* **40**, 9-17.
- [187] Sawhney, B., Chopra, K., Misra, R. & Ranjan, A. (2015) Identification of *Plasmodium falciparum* Apicoplast-Targeted tRNA-Guanine Transglycosylase and its Potential Inhibitors Using Comparative Genomics, Molecular Modelling, Docking and Simulation Studies. *J. Biomol. Struct. Dyn.* **33**, 2404-2420.

13. Referenzen

- [188] Garcia, G. A. & Kittendorf, J. D. (2005) Transglycosylation: A Mechanism for RNA Modification (and Editing?). *Bioorg Chem* **33**, 229-251.
- [189] Evans, G. B., Furneaux, R. H., Lewandowicz, A., Schramm, V. L. & Tyler, P. C. (2003) Exploring Structure–Activity Relationships of Transition State Analogues of Human Purine Nucleoside Phosphorylase. *J. Med. Chem.* **46**, 3412-3423.
- [190] Robak, T., Lech-Maranda, E., Korycka, A. & Robak, E. (2006) Purine Nucleoside Analogs as Immunosuppressive and Antineoplastic Agents: Mechanism of Action and Clinical Activity. *Curr. Med. Chem.* **13**, 3165-3189.
- [191] Balakrishnan, K., Ravandi, F., Bantia, S., Franklin, A. & Gandhi, V. (2013) Preclinical and Clinical Evaluation of Forodesine in Pediatric and Adult B-Cell Acute Lymphoblastic Leukemia. *Clin. Lymphoma, Myeloma Leuk.* **13**, 458-466.
- [192] Schramm, V. L. (2013) Transition States, Analogues, and Drug Development. *ACS Chem. Biol.* **8**, 71-81.
- [193] Erion, M. D., Stoeckler, J. D., Guida, W. C. & Walter, R. L. (1997) Purine Nucleoside Phosphorylase. 2. Catalytic Mechanism. *Biochemistry* **36**, 11735-11748.
- [194] Fedorov, A., Shi, W., Kicska, G., Fedorov, E., Tyler, P. C., Furneaux, R. H., Hanson, J. C., Gainsford, G. J., Larese, J. Z., Schramm, V. L. & Almo, S. C. (2001) Transition State Structure of Purine Nucleoside Phosphorylase and Principles of Atomic Motion in Enzymatic Catalysis†,‡. *Biochemistry* **40**, 853-860.
- [195] Basso, L. A., Santos, D. S., Shi, W., Furneaux, R. H., Tyler, P. C., Schramm, V. L. & Blanchard, J. S. (2001) Purine Nucleoside Phosphorylase from Mycobacterium Tuberculosis. Analysis of Inhibition by a Transition-State Analogue and Dissection by Parts. *Biochemistry* **40**, 8196-8203.
- [196] Lewandowicz, A., Tyler, P. C., Evans, G. B., Furneaux, R. H. & Schramm, V. L. (2003) Achieving the Ultimate Physiological Goal in Transition State Analogue Inhibitors for Purine Nucleoside Phosphorylase. *J. Biol. Chem.* **278**, 31465-31468.
- [197] Schrödinger Release 2014-2013: Macro Model Version 10.5 (2014). New York; NY: Schrödinger.
- [198] Schrödinger Release 2014-2013: Impact Version 6.4 (2014). New York, NY: Schrödinger.
- [199] Sauve, A. A., Cahill, S. M., Zech, S. G., Basso, L. A., Lewandowicz, A., Santos, D. S., Grubmeyer, C., Evans, G. B., Furneaux, R. H., Tyler, P. C., McDermott, A., Girvin, M. E. & Schramm, V. L. (2003) Ionic States of Substrates and Transition State Analogues at the Catalytic Sites of N-Ribosyltransferases†. *Biochemistry* **42**, 5694-5705.
- [200] Brenk, R., Naerum, L., Gradler, U., Gerber, H. D., Garcia, G. A., Reuter, K., Stubbs, M. T. & Klebe, G. (2003) Virtual Screening for Submicromolar Leads of tRNA-Guanine Transglycosylase Based on a New Unexpected Binding Mode Detected by Crystal Structure Analysis. *J. Med. Chem.* **46**, 1133-1143.
- [201] Meyer, E. A., Castellano, R. K. & Diederich, F. (2003) Interactions with Aromatic Rings in Chemical and Biological Recognition. *Angew. Chem., Int. Ed.* **42**, 1210-1250.
- [202] Tidten, N., Stengl, B., Heine, A., Garcia, G. A., Klebe, G. & Reuter, K. (2007) Glutamate Versus Glutamine Exchange Swaps Substrate Selectivity in tRNA-Guanine Transglycosylase: Insight Into the Regulation of Substrate Selectivity by Kinetic and Crystallographic Studies. *J. Mol. Biol.* **374**, 764-776.
- [203] Schramm, V. L. (2011) Enzymatic Transition States, Transition-State Analogs, Dynamics, Thermodynamics, and Lifetimes. *Annu. Rev. Biochem.* **80**, 703-732.
- [204] Barbieri, L., Valbonesi, P., Gorini, P., Pession, A. & Stirpe, F. (1996) Polynucleotide: Adenosine Glycosidase Activity of Saporin-L1: Effect on DNA, RNA and poly(A). *Biochem. J.* **319**, 507-513.
- [205] Sturm, M. B., Tyler, P. C., Evans, G. B. & Schramm, V. L. (2009) Transition State Analogues Rescue Ribosomes From Saporin-L1 Ribosome Inactivating Protein. *Biochemistry* **48**, 9941-9948.

13. Referenzen

- [206] Roday, S., Amukele, T., Evans, G. B., Tyler, P. C., Furneaux, R. H. & Schramm, V. L. (2004) Inhibition of Ricin A-Chain with Pyrrolidine Mimics of the Oxacarbenium Ion Transition State. *Biochemistry* **43**, 4923-4933.
- [207] Wang, S., Haapalainen, A. M., Yan, F., Du, Q., Tyler, P. C., Evans, G. B., Rinaldo-Matthis, A., Brown, R. L., Norris, G. E., Almo, S. C. & Schramm, V. L. (2012) A Picomolar Transition State Analogue Inhibitor of MTAN as a Specific Antibiotic for *H. pylori*. *Biochemistry* **51**, 6892-6894.
- [208] Shuker, S. B., Hajduk, P. J., Meadows, R. P. & Fesik, S. W. (1996) Discovering High-Affinity Ligands for Proteins: SAR by NMR. *Science* **274**, 1531-1534.
- [209] Scott, D. E., Coyne, A. G., Hudson, S. A. & Abell, C. (2012) Fragment-Based Approaches in Drug Discovery and Chemical Biology. *Biochemistry* **51**, 4990-5003.
- [210] Rees, D. C., Congreve, M., Murray, C. W. & Carr, R. (2004) Fragment-Based Lead Discovery. *Nat. Rev. Drug Discovery* **3**, 660-672.
- [211] Erlanson, D. A., McDowell, R. S. & O'Brien, T. (2004) Fragment-Based Drug Discovery. *J. Med. Chem.* **47**, 3463-3482.
- [212] Hubbard, R. E. & Murray, J. B. (2011). *Methods Enzymol.*, edited by C. K. Lawrence, pp. 509-531: Academic Press.
- [213] Murray, C. W. & Blundell, T. L. (2010) Structural Biology in Fragment-Based Drug Design. *Curr. Opin. Struct. Biol.* **20**, 497-507.
- [214] Baker, M. (2013) Fragment-Based Lead Discovery Grows up. *Nat. Rev. Drug Discovery* **12**, 5-7.
- [215] Joseph-McCarthy, D., Campbell, A. J., Kern, G. & Moustakas, D. (2014) Fragment-Based Lead Discovery and Design. *J. Chem. Inf. Model.* **54**, 693-704.
- [216] Cooper, J. B. (2002) Aspartic Proteinases in Disease: A Structural Perspective. *Curr. Drug Targets* **3**, 155-173.
- [217] Geschwindner, S., Olsson, L.-L., Albert, J. S., Deinum, J., Edwards, P. D., de Beer, T. & Folmer, R. H. A. (2007) Discovery of a Novel Warhead against β -Secretase through Fragment-Based Lead Generation. *J. Med. Chem.* **50**, 5903-5911.
- [218] Cooper, J., Quail, W., Frazao, C., Foundling, S. I., Blundell, T. L., Humblet, C., Lunney, E. A., Lowther, W. T. & Dunn, B. M. (1992) X-Ray Crystallographic Analysis of Inhibition of Endothiapepsin by Cyclohexyl Renin Inhibitors. *Biochemistry* **31**, 8142-8150.
- [219] Schechter, I. & Berger, A. (1967) On the Size of the Active Site in Proteases. I. Papain. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **27**, 157-162.
- [220] Neeb, M. (2014). Investigations on *lin*-Benzopurines With Respect to Dissociation Behavior, Pocket Cross-Talk, Targeting Resistance Mutants, Residual Mobility, and Scaffold Optimization, <http://dx.doi.org/10.17192/z2014.0419> ed. Philipps-Universität Marburg.
- [221] Jakobi, S. (2013). Nichtkompetitive Inhibition der tRNA-Guanin Transglycosylase durch Störung der essentiellen Protein-Protein-Interaktion, <http://dx.doi.org/10.17192/z2013.0380> ed. Philipps-Universität Marburg.
- [222] Gasteiger, E., Hoogland, C., Gattiker, A., Duvaud, S. e., Wilkins, M. R., Appel, R. D. & Bairoch, A. (2005). *The Proteomics Protocols Handbook*, edited by J. M. Walker, pp. 571-607. Totowa, NJ: Humana Press.
- [223] Dixon, M. (1953) The Determination of Enzyme Inhibitor Constants. *Biochem. J.* **55**, 170-171.
- [224] Leatherbarrow, R. J. (1992). GraFit Version 4.09, Erithacus Software Ltd., Staines, U.K.
- [225] Fukada, H. & Takahashi, K. (1998) Enthalpy and Heat Capacity Changes for the Proton Dissociation of Various Buffer Components in 0.1 M Potassium Chloride. *Proteins: Struct. Funct. Genet.* **33**, 159-166.
- [226] Goldberg, R. N., Kishore, N. & Lennen, R. M. (2002) Thermodynamic Quantities for the Ionization Reactions of Buffers. *J. Phys. Chem. Ref. Data* **31**, 231-370.
- [227] Keller, S., Vargas, C., Zhao, H., Piszczek, G., Brautigam, C. A. & Schuck, P. (2012) High-Precision Isothermal Titration Calorimetry with Automated Peak-Shape Analysis. *Anal. Chem.* **84**, 5066-5073.
- [228] Houtman, J. C. D., Brown, P. H., Bowden, B., Yamaguchi, H., Appella, E., Samelson, L. E. & Schuck, P. (2007) Studying Multisite Binary and Ternary Protein Interactions by Global

13. Referenzen

- Analysis of Isothermal Titration Calorimetry Data in SEDPHAT: Application to Adaptor Protein Complexes in Cell Signaling. *Protein Sci.* **16**, 30-42.
- [229] Brautigam, C. (2014). *GUSSI, 1.0.8e*, The University of Texas Southwestern Medical Center, Dallas, TX.
- [230] Kabsch, W. (2010) XDS. *Acta Crystallogr., Sect. D.* **66**, 125-132.
- [231] Matthews, B. W. (1968) Solvent Content of Protein Crystals. *J. Mol. Biol.* **33**, 491-497.
- [232] Kantardjieff, K. A. & Rupp, B. (2003) Matthews Coefficient Probabilities: Improved Estimates for Unit Cell Contents of Proteins, DNA, and Protein–Nucleic Acid Complex Crystals. *Protein Sci.* **12**, 1865-1871.
- [233] McCoy, A. J. (2007) Solving Structures of Protein Complexes by Molecular Replacement with Phaser. *Acta Crystallogr., Sect. D.* **63**, 32-41.
- [234] Adams, P. D., Afonine, P. V., Bunkóczi, G., Chen, V. B., Davis, I. W., Echols, N., Headd, J. J., Hung, L.-W., Kapral, G. J., Grosse-Kunstleve, R. W., McCoy, A. J., Moriarty, N. W., Oeffner, R., Read, R. J., Richardson, D. C., Richardson, J. S., Terwilliger, T. C. & Zwart, P. H. (2010) PHENIX: A Comprehensive Python-based System for Macromolecular Structure Solution. *Acta Crystallogr., Sect. D.* **66**, 213-221.
- [235] Emsley, P. & Cowtan, K. (2004) Coot: Model-Building Tools for Molecular Graphics. *Acta Crystallogr., Sect. D.* **60**, 2126-2132.
- [236] Painter, J. & Merritt, E. A. (2006) Optimal Description of a Protein Structure in Terms of Multiple Groups Undergoing TLS Motion. *Acta Crystallogr., Sect. D.* **62**, 439-450.
- [237] Smart, O. S., Womack, T. O., Sharff, V., Flensburg, C., Keller, P., Paciorek, W., Vornrhein, C. & Bricogne, G. (2015). *Grade, Vol. 2015 Cambridge, United Kingdom, Global Phasing Ltd.*, <http://www.globalphasing.com>,
- [238] Thorn, A. & Sheldrick, G. M. (2011) ANODE: Anomalous and Heavy-Atom Density Calculation. *J. Appl. Crystallogr.* **44**, 1285-1287.
- [239] McLachlan, A. D. (1982) Rapid Comparison of Protein Structures. *Acta Crystallogr., Sect. A.* **38**, 871-873.
- [240] DeLano, W. L. (2002). The PyMOL Molecular Graphics System (2002) on World Wide Web <http://www.pymol.org>.
- [241] Hohn, C. (2015) Inhibitors of tRNA–Guanine Transglycosylase: From *lin*-Benzopurines to Transition State and Nucleobase Analogues. Dissertation, ETH-Zürich, Zürich.
- [242] Song, J., Laskowski, M., Jr., Qasim, M. A. & Markley, J. L. (2003) NMR Determination of pK_a Values for Asp, Glu, His, and Lys Mutants at Each Variable Contiguous Enzyme-Inhibitor Contact Position of the Turkey Ovomucoid Third Domain. *Biochemistry* **42**, 2847-2856.
- [243] Kleywegt, G. J., Zou, J. Y., Kjeldgaard, M. & Jones, T. A. (2006). *International Tables for Crystallography Volume F: Crystallography of Biological Macromolecules*, edited by M. G. Rossmann & E. Arnold, pp. 353-356: Springer Netherlands.

Abkürzungsverzeichnis

Å	Ångström ($1 \text{ Å} = 10^{-10} \text{ m}$)
$A_{280\text{nm}}$	Adsorption bei 280 nm
ADMET	<i>Absorption, Distribution, Metabolism, Excretion, Toxicity</i>
APS	Ammoniumperoxodisulfat
°C	Grad Celsius
c	centi-
$\text{clog}P$	Berechneter dekadischer Logarithmus des Oktanol-Wasser-Verteilungskoeffizienten
$\text{clog}D_{7.4}$	Berechneter dekadischer Logarithmus des Oktanol-Puffer (pH 7.4)-Verteilungskoeffizienten
CSD	<i>Cambridge Structural Database</i>
d	<i>distance</i> (Distanz)
ΔG^0	Gibbssche freie Energie
ΔH^0 bzw. ΔH_{bind}	Bindungsenthalpie
ΔH_{ion}	Ionisierungsenthalpie
ΔH_{obs}	Gemessene Enthalpie der Bindung (nicht hinsichtlich der Ionisierungsenthalpie korrigiert)
ΔS^0	Bindungsentropie
Da	Dalton
DMSO	Dimethylsulfoxid
DTT	1,4-Dithiothreitol
<i>E.coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECY2	Unmodifizierte <i>Escherichia coli</i> tRNA ^{Tyr}
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
EIEC	Enteroinvasive <i>E. coli</i>
ESI	<i>Electron spray ionization</i>
FBDD	<i>Fragment based drug discovery</i>
F_c	Berechnete Strukturfaktor Amplituden
F_o	Beobachtete Strukturfaktor Amplituden
g	Gramm
h	<i>hour(s)</i> (Stunde(n))
HABA	2-(4-Hydroxyphenylazo)-benzoesäure
H-Brücke	Wasserstoffbrücke
H-Bond	
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazinyl)ethansulfonsäure
HTS	<i>High Throughput Screening</i>
HUS	Hämolytisch-urämische Syndrom
IFN	Interferon

Abkürzungsverzeichnis

IL	Interleukin
IPTG	Isopropyl- β -D-thiogalactopyranosid
ITC	Isothermale Titrationskalorimetrie
K	Kelvin
kb	Kilobasen
kcal	Kilocalorie
K_d	Dissoziationskonstante
K_i	Inhibitionskonstante
kJ	Kilojoule
K_m	Michaelis-Menten-Konstante
LB	Luria-Bertani (Nährmedium)
L bzw. l	Liter
M	Mega
m	Meter; milli
M	Molarität ($\text{mol} \cdot \text{L}^{-1}$)
μ	Micro
MES	2-(N-Morpholino)ethansulfonsäure
min	Minute
MOPSO	3-Morpholino-2-hydroxy-propansulfonsäure
MR	<i>Molecular replacement</i> (Molekularer Ersatz)
MS	Massenspektrometrie
m/v	Masse pro Volumen
MW	<i>Molecular weight</i> (Molekulargewicht)
MWCO	<i>Molecular weight cut off</i>
MST	<i>Microscale thermophoresis</i>
n	Nano
n.b.	Nicht bestimmt
OD ₆₀₀	Optische Dichte bei 600 nm
p	Pico
PAMPA	<i>Parallel Artificial Membrane Permeability Assay</i>
PDB	<i>Protein data bank</i>
PDB ID	<i>Protein data bank identifier</i>
PEG	Polyethylenglycol
pH	Negativer dekadischer Logarithmus der Wasserstoffionen-Aktivität
pK _a	Negativer dekadischer Logarithmus der Säurekonstante K_a
PML	Polymorphkernige Leukozyten
PPI	Protein-Protein Interaktion
rpm	<i>Rounds per Minute</i>
S.	<i>Shigella</i>

Abkürzungsverzeichnis

s/sek	Sekunde
SBDD	<i>Structure based drug discovery</i>
SDS page	<i>Sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i>
SPR	<i>Surface plasmon resonance</i>
STD	<i>Saturation-transfer difference</i>
T	Temperatur in Kelvin
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
TGT	tRNA-Guanin-Transglycosylase
TLS	<i>Translation, Liberation, Screw</i>
Tricin	N-(Tri(hydroxymethyl)methyl)glycin
TRIS	2-Amino-2-(hydroxymethyl)propan-1,3-diol
TSA	<i>Thermal Shift Assay</i>
tRNA	Transfer-Ribonukleinsäure
UV	Ultraviolett
v	Volumen
v_i	Anfangsgeschwindigkeit
v_0	Initiale Geschwindigkeit
v_{\max}	Maximale Geschwindigkeit
v/v	Volumen pro Volumen
W	Watt
wt	<i>Wild type</i>
<i>Z. mobilis</i>	<i>Zymomonas mobilis</i>
°	Grad
λ	Wellenlänge

Für die Benennung von Aminosäuren wurde der Dreibuchstabencode verwendet.

Danksagung

In meiner Promotion konnte ich auf große Hilfe zahlreicher Menschen zählen, ohne die es nicht möglich gewesen wäre, diese Dissertation anzufertigen.

Zunächst möchte ich mich besonders bei meinem Doktorvater *Prof. Dr. Gerhard Klebe* für sein Vertrauen und seine kontinuierliche Unterstützung herzlichst bedanken. Ich bin überaus dankbar für die Freiheit bei allen Forschungsvorhaben während meiner Promotion und den interessanten und vielfältigen Projekten in einer hervorragenden Arbeitsatmosphäre in Ihrer Arbeitsgruppe. Ich möchte mich weiterhin bedanken, für die verlässlichen Kooperationen mit anderen Arbeitsgruppen, die Teilnahmen an vielen wissenschaftlichen Konferenzen, den Aufenthalten in Hirscheegg und den Dienstreisen an die Synchrotrons. Letztendlich danke ich Ihnen für das sorgfältige Korrekturlesen meiner Dissertation und für Ihre stete Gesprächs- und Diskussionsbereitschaft. Es war eine schöne, lehrreiche und aufregende Zeit in der Arbeitsgruppe Klebe, die ich nie vergessen werde.

Ich danke *Prof. Dr. Klaus Reuter* für die freundliche Annahme meiner Dissertation als Zweitgutachter. Des Weiteren danke ich ihm für seine Hilfe bei der Interpretation der experimentellen Daten und der Erstellung des „*Soaking vs. Co-Crystallization*“-Manuskripts.

Darüber hinaus möchte ich *Prof. Dr. Andreas Heine* danken, nicht nur für die anfängliche ausgezeichnete Einführung in die Röntgenkristallographie, sondern auch für die stets gute Zusammenarbeit, die Diskussionen und der Hilfe bei allen kristallographischen Fragestellungen bei den von mir bearbeiteten Proteinkristallstrukturen.

Ein wesentlicher Teil dieser Promotion bestand in der Charakterisierung von Liganden, die aus der ausgesprochen produktiven Zusammenarbeit mit der Arbeitsgruppe von *Prof. Dr. François Diederich* (ETH Zürich) stammen. Ich möchte mich auch bei *Dr. Luzi Jakob Barandun*, *Dr. Christoph Hohn*, *Dr. Toni Pfaffeneder* und *Elisabeth Schäfer* für ihre kollegiale Unterstützung und Beiträge zu meiner Dissertation bedanken. Sie sind echte Kenner der organischen Synthese unserer entwickelten TGT-Inhibitoren. Die vielen Videokonferenzen, in denen ausführlich über alle Facetten der TGT-Inhibitoren diskutiert wurde, waren immer eine Bereicherung und verlässliche Quelle neuer Ideen.

Danksagung

Ich möchte auch *Dr. Sarah Cianférani, Dr. François Debaene, Dr. Johann Stojko* und *Thomas Botzanowski* aus Straßburg (LSMBO) für ihre nanoESI-MS Messungen unserer TGT-Inhibitoren danken. Ohne Ihre Beiträge wären viele Fragestellungen noch offen.

Mein Dank geht auch an *Severin Wendelspiess* und *Virginie Micallef* von der Firma F.Hoffmann-La Roche AG für die Bestimmung der PAMPA-Werte und den pK_a -Messungen.

Ein besonderer Dank geht an *Dr. Alexander Metz* für seine großzügige Hilfe bei der Korrektur meiner Manuskripte. Mit seinem „Pflug“ konnte er zahlreiche Ideen beitragen und meine Manuskripte optimieren.

Katharina Schengel, Sascha Wittig, Phong Nguyen, Nedyalka Radeva, Engi Hassan und *Felix Terwesten* möchte ich danken für das Korrekturlesen einiger Manuskripte.

Dr. Chris Rechlin, Phong Nguyen, Dr. Manuel Neeb, Dr. Florian Immekus und *Dr. Michael Betz* sei mein Dank ausgesprochen für die umfangreiche und geduldige Einführung in das Themengebiet des strukturbasierten Wirkstoffdesings und des TGT-Projekts zu Beginn meiner Promotion.

Lydia Hartleben ist für ihre Unterstützung in allen organisatorischen und administrativen Angelegenheiten zu danken.

Herrn *Christian Sohn* möchte ich danken für die Betreuung und Wartung der *in-house*-Röntgengeräte und die stete Reparatur dieser, als auch die Geräte des S1-Labors.

Ich danke den Computer-Administratoren der Gruppe *Felix Terwesten, Phong Nguyen, Dr. Michael Betz* und *Dr. Timo Krotzky* für den reibungslosen Support und die schnelle und freundliche Unterstützung in allen Fragen bezüglich unseres Computer-Netzwerks.

Mein Dank geht auch an *Nicole Bertoletti, Martin Stieler, Namir Abazi* und *Felix Terwesten* für die angenehme Büroatmosphäre und die vielen kurzweiligen Unterhaltungen.

Danksagung

Ich möchte mich auch bei *Dzung Nguyen* bedanken, der ein ausgedehntes und mit großem Engagement verbundenes Praktikum bei mir absolvierte. Es ist gut zu wissen, dass das TGT-Projekt in seinen Händen nächstes Jahr weitergeht.

Bei dem *Personal* des BESSY II in Berlin, DESY in Hamburg und des ELETTRA Synchrotrons in Triest möchte ich mich für die freundliche und stets hilfreiche Unterstützung bei den kristallographischen Experimenten bedanken.

Ich danke der gesamten Arbeitsgruppe Klebe, für die schöne und produktive Atmosphäre. Insbesondere *Phong Nguyen*, *Dr. Chris Rechlin*, *Dr. Eggert Rühmann*, *Nedyalka Radeva* und *Martin Stieler* für all die Gespräche und gemeinsamen Erlebnisse. Die besondere Zeit, die wir hier in Marburg hatten, zeigt sich in unserer langjährigen Freundschaft.

Ich möchte meiner Familie danken, insbesondere meinen Eltern *Iris* und *Dieter Ehrmann* und meinen Geschwistern *Carolin* und *Florian*, für ihre bedingungslose Unterstützung, dem Interesse an meiner Arbeit und die aufbauenden Gespräche.

Abschließend möchte ich mich vor allem bei Dir, *Katharina Schengel*, für die uneingeschränkte Unterstützung und den Rückhalt, für das Korrekturlesen dieser Arbeit, Dein Verständnis und Deine unermüdliche Motivation während der letzten Jahre aus tiefstem Herzen bedanken. Durch unsere tiefe Verbundenheit und Liebe hast Du einen maßgeblichen Anteil zu dieser Arbeit beigetragen. Ich danke Dir!

Eidesstattliche Erklärung

Erklärung

(gemäß § 10 der Promotionsordnung)

Ich versichere, dass ich meine Dissertation

**Strukturbasierte Entwicklung und Charakterisierung von Inhibitoren der TGT,
ein mögliches Ziel zur Therapie der Bakterienruhr**

selbständig ohne unerlaubte Hilfe angefertigt und mich dabei keiner anderen als der von mir ausdrücklich bezeichneten Quellen bedient habe. Alle vollständig oder sinngemäß übernommenen Zitate sind als solche gekennzeichnet.

Die Dissertation wurde in der jetzigen oder einer ähnlichen Form noch bei keiner anderen Hochschule eingereicht und hat noch keinen sonstigen Prüfungszwecken gedient.

Marburg, den 29.11.2016

Frederik Rainer Ehrmann

Lebenslauf

Diese Seite enthält persönliche Daten. Sie ist daher nicht Bestandteil der Online-Veröffentlichung.